

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
HENRIQUE RAVANHOL FRIGERI

Variabilidade Genética e Sequenciamento de Genes associados ao *Diabetes mellitus* tipo 2 e à Obesidade

CURITIBA
2015

HENRIQUE RAVANHOL FRIGERI

Variabilidade Genética e Sequenciamento de Genes associados ao *Diabetes mellitus* tipo 2 e à Obesidade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth.

Co-orientadores: Profa. Dra. Fabiane G. de M. Rego.
Profa. Dra. Dayane Alberton.

CURITIBA

2015

Frigeri, Henrique Ravanhol

Variabilidade genética e sequenciamento de genes associados ao *Diabetes mellitus* tipo 2 e à obesidade / Henrique Ravanhol Frigeri – Curitiba, 2015.
129 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Coorientadora: Professora Dra. Fabiane G. de M. Rego

Coorientadora: Professora Dra. Dayane Alberton

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. *Diabetes mellitus* gestacional. 2. *Diabetes mellitus* tipo 2. 3. Obesidade. 4. Genes-alvo.
5. Variabilidade genética. I. Picheth, Geraldo. II. Rego, Fabiane G. de M. III. Alberton, Dayane.
IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

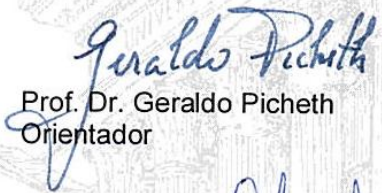
CDD 616.462

TERMO DE APROVAÇÃO

HENRIQUE RAVANHOL FRIGERI

Título: “Variabilidade Genética e Sequenciamento de Genes associados ao Diabetes mellitus tipo 2 e à Obesidade”


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.




Prof. Dr. Geraldo Picheth
Orientador




Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Kátia Sabrina Paludo
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Curitiba, 18 de setembro de 2015.

Dedico esta tese às pessoas que tanto amo:

Paulo Ravanhol Frigeri,

Marcia Ravanhol Fontequ Frigeri e

Luiz Henrique Fontequ Frigeri.

AGRADECIMENTOS

ACADEMIA

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo espaço físico, por toda a estrutura cedida a mim, bem como a oportunidade.

Ao Valter Baura, do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, muito importante por toda a disposição e prontidão no processamento final das reações de sequenciamento.

À Zeni Vogler, à Maria Silvia Néia Martini Lobo e à Heloisa Salomão. Estimadas, muito obrigado por todo apoio!!!

À PUCPR por todo apoio. Em especial ao prof. Rodrigo Távora Mira, coordenador do curso de Biotecnologia (PUCPR), e aos professores Marcelo Távora Mira, Vanessa Santos Sotomaior, Maria Cristina Vasconcellos e Silvia Schmidlin Keil por todo apoio, conversas e compreensão neste período de doutorado.

Aos meus alunos de Iniciação científica, por ordem cronológica, Laysa Toschi Martins, Nathalia Cavalheiro Auwerter, Isabelle Letícia Zaboroski Silva, Fellipe Cavalheiro Ferreira Dias, Giovanna Zuzarte Candido e Leticia Koczicki. Muito obrigado por todos os momentos, conversas, todas as risadas e toda a ajuda. Não tenho dúvida que vocês foram e são os melhores orientados que um orientador poderia sonhar em ter.

À Dra. Bruna Carla Agustini por tudo. Vale destacar a paciência, companhia e apoio mesmo estando tão longe, mas ao mesmo tempo tão perto. Todos sabemos sua importância em todo esse período.

A todos os membros da banca examinadora, Professores Doutores: Geraldo Picheth (Orientador, UFPR), Emanuel Maltempi de Souza (UFPR), Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth (UFPR), Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza (UFPR) e Kátia Sabrina Paludo (UEPG) que aceitaram avaliar esta tese.

A todos os colegas de laboratório, por todos os momentos compartilhados. Em especial ao Waldemar Volanski, Marciane Welter, Luiza Gobor e Mauren Isfer Anghebem-Oliveira. Todos sabem o quão foram importantes!!! Muito obrigado por tudo!!!

Um agradecimento especial à profa. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth por ter lido “até as vírgulas” da minha tese na qualificação e por ter feito

considerações muito importantes!!! Professora, sua experiência prova que sempre podemos melhorar. Obrigado também à profa. Dra. Karin Braun Prado. Também ao prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza por todo acesso no departamento de bioquímica, todo suporte, professor... simplesmente, muito obrigado por TUDO!!

Às minhas Co-orientadoras profa. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego e profa. Dra. Dayane Alberton aos quais sou muito grato por todo apoio, principalmente em momentos que julguei tão necessários.

Ao meu orientador e “Pai Científico” prof. Dr. Geraldo Picheth. Por todo o ensinamento, discussões e brigas, claro que todas saudáveis e necessárias para que eu pudesse crescer ainda mais, principalmente, em meu espírito crítico. Professor, seria necessária talvez uma outra tese inteira pra eu falar tudo o que sinto e minha admiração pelo senhor. Resumidamente, muito obrigado por TUDO!!! Foi uma honra ter sido seu orientado!!! Como já lhe disse, em minha opinião, o senhor “está muito além...”

FAMÍLIA

Agradeço a todos os meus familiares: avôs, avós, tios, tias, primos e primas (tanto daqui de Curitiba quanto de outros lugares, assim como de minha terra natal). Vó Dita e Vó Déte, obrigado por tudo, mas principalmente, pelas orações. A todos os outros agradeço por todo carinho, compreensão, força, apoio e proteção direcionados a mim tanto aqui na terra, quanto do céu (Vô Didi e Vô Nute).

Às pessoas que mais amo: Meu irmão Paulo Ravanhol Frigeri. Paulo, novamente obrigado pela companhia e por ficar me ouvindo em momentos de pouca ou muita alegria, mesmo não estando muito interessado em ouvir. Claro que sempre continuarei falando, pois preciso cumprir com a minha função de irmão mais velho. Minha mãe e meu pai (Marcia Ravanhol Fontequ Frigeri e Luiz Henrique Fontequ Frigeri), muito, mas MUITO OBRIGADO pela paciência nesses seis anos (2 de mestrado e 4 de doutorado). MUITO OBRIGADO pelo carinho, apoio, conversas, por nos mantermos unidos e fortes em momentos de tristeza e da mesma forma em momentos de alegria. MUITO OBRIGADO por acreditarem em mim. Isso tudo não seria possível sem vocês.

A Deus, por TUDO e por tornar isso tudo possível.

“Só a Educação Liberta”.

Epicteto.

*“Não há como perder sem, ao
mesmo tempo, ganhar”.*

Henrique Ravanhol Frigeri

RESUMO

O *Diabetes mellitus* tipo 2 (T2DM) e o *Diabetes mellitus* gestacional (GDM) estão associados à obesidade (Ob) e são processos patológicos de frequência crescentes no mundo, apresentando elevada morbimortalidade. Múltiplos fatores genéticos estão associados ao T2DM e GDM, embora sejam pouco estudados na população brasileira. Estudar variações genéticas e biomarcadores laboratoriais associados ao risco ou à proteção para o T2DM e GDM, caracteriza o objetivo do presente estudo. O Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Paraná (UFPR) aprovou esta pesquisa, CAAE: 01038012.2.0000.0102. Os parâmetros antropométricos e laboratoriais (perfis glicêmico e lipídico, bem como de função renal) foram igualmente avaliados. Os polimorfismos foram investigados com sondas fluorescentes (*TaqMan*[®]) ou por sequenciamento de DNA (Big Dye). Um estudo com gestantes incluiu 115 saudáveis (CTRL) e 112 portadoras de GDM e o polimorfismo *rs2268574:T>C* do gene da glucoquinase (*GCK*). O polimorfismo *rs2268574:T>C* foi associado à proteção para o GDM (alelo-*T*, CTRL 48,3% vs GDM 38,4%; $P=0,034$), com razão de chance de 1,5 (95%IC, 1,03-2,17). Outro estudo envolveu 313 mulheres (idade ≥ 40 anos) classificadas em grupo controle saudável (CTRL, $n=141$), T2DM obesas (ObT2DM, $n=130$; $IMC>30\text{kg/m}^2$) e obesas não portadoras de T2DM (Ob, $n=42$). Os genes e polimorfismos estudados foram: *PPARG* (*rs1801282:C>G*), *IGF2BP2* (*rs4402960:G>T*), *GCK* (*rs144723656:C>T*, *rs2268574:T>C*, *rs2268575:A>G*), *GCKR* (*rs780094:C>T*), *TCF7L2* (*rs7901695:T>C*), *LEP* (*rs7799039:A>G*), *LEPR* (*rs1137100:A>G*, *rs1137101:A>G*), *SLC30A8* (*rs13266634:C>T*), *FTO* (*rs8050136:A>C*, *rs1421085:T>C*, *rs9930506:A>G*), e *GHRL* (*rs73125661:A>G*, *rs57221010:A>C*, *rs1629816:C>T*, *rs10490815:A>G*, *rs27498:C>T*, *rs27647:G>A*, *rs26802:A>C*, *rs55821288:G>A*, *rs35679:G>A*, *rs35680:G>A*, *rs35682:C>T*, *rs4684677:A>T*, *rs35683:C>T*). Os polimorfismos não foram associados aos grupos em estudo. O gene da preprogrelina (*GHRL*) foi sequenciado por completo em uma subamostra contendo 20 indivíduos; CTRL=5, ObT2DM=10 e Ob=5). Foram identificados 13 polimorfismos (*rs73125661:A>G*, *rs57221010:A>C*, *rs1629816:C>T*, *rs10490815:A>G*, *rs27498:C>T*, *rs27647:G>A*, *rs26802:A>C*, *rs55821288:G>A*, *rs35679:G>A*, *rs35680:G>A*, *rs35682:C>T*, *rs4684677:A>T* e *rs35683:C>T*) sem que um marcador molecular (*Tagging SNP*) para os processos patológicos fosse identificado. Todas as variáveis estudadas avaliando o diabetes tipo 2 e/ou obesidade não mostraram associação ($P>0,05$) com estes processos patológicos avaliados, assim como parâmetros antropométricos e laboratoriais. Após análises *in silico*, as variantes do gene *GCK* *rs144723656:C>T* e *rs2268574:T>C* foram identificadas em uma sequência considerada como facilitadora do processamento do RNA (*splicing*), enquanto que a variante *rs2268575:A>G* do mesmo gene, em região com potencial de silenciar este processo. As frequências alélicas dos polimorfismos em estudo foram em geral similares às descritas em outras populações Caucasoídes. Vários polimorfismos têm neste estudo sua primeira descrição quanto à suas frequências em uma amostra da população brasileira.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus* Gestacional, *Diabetes mellitus* tipo 2, obesidade, genes-alvo, variabilidade genética.

ABSTRACT

The Type 2 *Diabetes mellitus* (T2DM) and Gestational *Diabetes mellitus* (GDM) are associated with obesity (Ob) and are pathological processes of increasing frequency in the world, with high morbidity and mortality. Multiple genetic factors are associated with T2DM and GDM, although little of them are studied in the Brazilian population. The study of genetic variations and laboratory biomarkers associated with increased risk or protection for T2DM and GDM characterizes the aim of this study. The Ethics Committee of the Federal University of Paraná (UFPR) approved this research, CAAE search: 01038012.2.0000.0102. Anthropometric and laboratory parameters (glycemic and lipid profiles and kidney function) were assessed. The polymorphisms were investigated with fluorescent probes (*TaqMan*[®]) or by DNA sequencing (*BigDye*). The study included 115 healthy pregnant women (CTRL) and 112 women with GDM and the polymorphism *rs2268574:T>C* of the glucokinase gene (*GCK*). The polymorphism *rs2268574:T>C* was associated with protection for GDM (T-allele, CTRL 48.3% vs GDM 38.4%; $P = 0.034$), with an odds ratio of 1.5 (95% CI, 1.03 - 2.17). The other study investigated 313 women (age ≥ 40 years) classified in healthy control group (CTRL, $n = 141$), obese T2DM (ObT2DM, $n = 130$; BMI $> 30\text{kg/m}^2$) and obese non T2DM carriers (Ob, $n = 42$). The studied genes and polymorphisms were: *PPAR* (*rs1801282C>G*), *IGF2BP2* (*rs4402960:G>T*), *GCK* (*rs144723656:C>T*, *rs2268574:T>C*, *rs2268575:A>G*), *GCKR* (*rs780094:C>T*), *TCF7L2* (*rs7901695:T>C*), *LEP* (*rs7799039:A>G*), *LEPR* (*rs1137100:A>G*, *rs1137101:A>G*), *SLC30A8* (*rs13266634:C>T*), *FTO* (*rs8050136:A>C*, *rs1421085:T>C*, *rs9930506:A>G*), and *GHRL* (*rs73125661:A>G*, *rs57221010:A>C*, *rs1629816:C>T*, *rs10490815:A>G*, *rs27498:C>T*, *rs27647:G>A*, *rs26802:A>C*, *rs55821288:G>A*, *rs35679:G>A*, *rs35680:G>A*, *rs35682:C>T*, *rs4684677:A>T*, *rs35683:C>T*) polymorphisms were not associated to the study groups. The preproghrelin gene (*GHRL*) was completely sequenced on a subsample composed by 20 subjects, CTRL = 5, ObT2DM = 10 and Ob = 5). In this gene were identified 13 polymorphisms (*rs73125661:A>G*, *rs57221010:A>C*, *rs1629816:C>T*, *rs10490815:A>G*, *rs27498:C>T*, *rs27647:G>A*, *rs26802:A>C*, *rs55821288:G>A*, *rs35679:G>A*, *rs35680:G>A*, *rs35682:C>T*, *rs4684677:A>T* and *rs35683:C>T*) without identification of a molecular marker (Tagging SNP) for the studied pathological processes. All variables evaluating type 2 diabetes and/or obesity were not associated ($P>0.05$) with the studied pathological processes, as well as anthropometric and laboratory parameters. After *in silico* analyzes, variants of *GCK* gene (*rs144723656:C>T* and *rs2268574:T>C*) were identified in a sequence considered as a enhancer of RNA processing (splicing), while the variant *rs2268575:A>G* at the same gene, in a potential region to silence this process. The allelic frequencies of the polymorphisms in the study were generally similar to those described in other Caucasian populations. Several polymorphisms have first described as to their frequencies in a sample of the Brazilian population.

Keywords: Gestational *Diabetes mellitus*, Type 2 *Diabetes mellitus*, obesity, target-genes, genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EVOLUÇÃO ANUAL DO <i>DIABETES MELLITUS</i> NO BRASIL.	24
FIGURA 2 – GENES INVESTIGADOS, PRINCIPAIS FUNÇÕES E ASSOCIAÇÕES.	42
FIGURA 3 – VARIANTES GENOTIPADAS COM SONDAS <i>TAQMAN</i> [®]	43
FIGURA 4 – AMPLICONS 1 E 2 DA VARIANTE <i>RS2268574:T>C (GCK)</i>	44
FIGURA 5 – ESTRUTURA DO GENE <i>GHRL</i> , PRIMERS E AMPLICONS.....	45
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE EXECUÇÃO DA PESQUISA.....	46
FIGURA 7 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO AMPLICON 1 DA VARIANTE <i>RS2268574:T>C (GCK)</i>	62
FIGURA 8 – LOCALIZAÇÃO E ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DO AMPLICON 1 DA VARIANTE <i>RS2268574:T>C (GCK)</i>	63
FIGURA 9 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO AMPLICON 2 DA VARIANTE <i>RS2268574:T>C (GCK)</i>	70
FIGURA 10 – VARIANTES ENCONTRADAS NO AMPLICON 2 DO GENE <i>GCK</i>	71
FIGURA 11 – ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DE <i>SPLICING</i> DO AMPLICON 2 DO GENE <i>GCK</i>	75
FIGURA 12 – PERFIS ELETROFORÉTICOS DO PRIMEIRO AO OITAVO AMPLICON DO GENE <i>GHRL</i>	94
FIGURA 13 – PERFIS ELETROFORÉTICOS DO NONO AO DÉCIMO SEXTO AMPLICON DO GENE <i>GHRL</i>	95
FIGURA 14 – PERFIS ELETROFORÉTICOS DO DÉCIMO SÉTIMO AO DÉCIMO NONO AMPLICON DO GENE <i>GHRL</i>	96
FIGURA 15 – VARIANTES IDENTIFICADAS NO GENE <i>GHRL</i>	97
FIGURA 16 – VARIANTES DO AMPLICON 1 DO GENE <i>GHRL</i>	98
FIGURA 17 – VARIANTE DO AMPLICON 4 DO GENE <i>GHRL</i>	99
FIGURA 18 – VARIANTE DO AMPLICON 6 DO GENE <i>GHRL</i>	100
FIGURA 19 – VARIANTES DO AMPLICON 9 DO GENE <i>GHRL</i>	101
FIGURA 20 – VARIANTES DO AMPLICON 13 DO GENE <i>GHRL</i>	103
FIGURA 21 – VARIANTES DO AMPLICON 17 DO GENE <i>GHRL</i>	104
FIGURA 22 – VARIANTE DO AMPLICON 18 DO GENE <i>GHRL</i>	106
FIGURA 23 – EXEMPLO DE PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO (A) E DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA (B) DO MÉTODO DE <i>TAQMAN</i> [®]	129

QUADRO E LISTA DE TABELAS

QUADRO 1 – PRINCIPAIS TIPOS DE DIABETES, CARACTERÍSTICAS E CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO.....	22
TABELA 1 – DIAGNÓSTICO DA OBESIDADE PELA CLASSIFICAÇÃO DE PESO DE ACORDO COM O IMC E RISCOS.....	25
TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS.	47
TABELA 3 – PRIMERS (01-10) PARA O GENE <i>GHRL</i>	49
TABELA 4 – PRIMERS (11-19) PARA O GENE <i>GHRL</i> E PARA O GENE <i>GCK</i>	50
TABELA 5 – CONDIÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE PCR.....	51
TABELA 6 – PROTOCOLO DE DIGESTÃO, SEQUENCIAMENTO E PURIFICAÇÃO.	53
TABELA 7 – POLIMORFISMOS GENOTIPADOS PELO MÉTODO <i>TAQMAN</i> [®]	54
TABELA 8 – PROTOCOLO DEFINIDO PARA TÉCNICA DE <i>TAQMAN</i> [®] EM PCR EM TEMPO REAL.....	55
TABELA 9 – BIOMARCADORES AVALIADOS NESTE ESTUDO.....	56
TABELA 10 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ANTROPOMÉTRICAS, FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DO SNP <i>RS2268574:T>C</i> DO GENE <i>GCK</i> NA AUSÊNCIA (CTRL) OU PRESENÇA DO <i>DIABETES MELLITUS</i> GESTACIONAL (GDM).....	59
TABELA 11 – CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E LABORATORIAIS DE MULHERES DOS GRUPOS CTRL, ObT2DM E Ob.....	66
TABELA 12 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES DO AMPLICON 2 DO GENE <i>GCK</i> POR MODELOS GENÉTICOS.	73
TABELA 13 – COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS MENORES DAS VARIANTES DO GENE <i>GCK</i> COM OUTRAS POPULAÇÕES.	74
TABELA 14 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES SELECIONADAS PARA OS GRUPOS CTRL E ObT2DM	78
TABELA 15 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES SELECIONADAS PARA OS GRUPOS CTRL E Ob.....	79
TABELA 16 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES SELECIONADAS PARA OS GRUPOS ObT2DM E Ob.....	80

TABELA 17 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES DOS GENES <i>IGF2BP2</i> , <i>GCKR</i> , <i>TCF7L2</i> E <i>SLC30A8</i> POR MODELOS GENÉTICOS.....	82
TABELA 18 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES DOS GENES <i>PPARG</i> , <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> E <i>FTO</i> POR MODELOS GENÉTICOS.	83
TABELA 19 – COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS MENORES DOS GENES <i>IGF2BP2</i> , <i>GCKR</i> , <i>TCF7L2</i> E <i>SLC30A8</i> COM OUTRAS POPULAÇÕES.	84
TABELA 20 – COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS MENORES DOS GENES <i>PPARG</i> , <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> E <i>FTO</i> COM OUTRAS POPULAÇÕES.	89
TABELA 21 – FREQUÊNCIAS DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS AMPLICONS 1 AO 9 DO GENE <i>GHRL</i> POR GRUPO ESTUDADO	108
TABELA 22 – FREQUÊNCIAS DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS AMPLICONS 10 AO 19 DO GENE <i>GHRL</i> POR GRUPO ESTUDADO	109
TABELA 23 – COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS DO ALELO MENOR DAS VARIANTES DO GENE <i>GHRL</i> COM OUTRAS POPULAÇÕES.	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO(S)
2OG	Enzimas Fe(II)- e 2-oxoglutarato oxigenases
95% IC	Intervalo de Confiança de 95%
A	Base adenina ou nucleotídeo desoxiadenilato
ABR	Abreviaturas
ADA	<i>American Diabetes Association</i> , Associação Americana de Diabetes
ALB	Albumina
AR	Alelo Recessivo
ATP	Adenosina Trifosfato
AU	Ácido Úrico
beta-cat, β -cat	β -catenina
C	Base Citosina ou nucleotídeo desoxicitidilato
CD	Modelo Genético Codominante
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
COL	Colesterol total
CRE	Creatinina
CTRL	Grupo de indivíduos saudáveis, controle
CVa (%)	Coeficiente de Variação Analítica entre ensaios (%)
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Ácido desoxirribonucleico
DO	Modelo Genético Dominante
DSBH	Dupla cadeia beta-hélice
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> , Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EXO	Exonuclease I
FAM	Frequência do Alelo Menor
FGA	Frequência Genotípica e Alélica
FREQ (%)	Frequência (%)
<i>FTO</i>	<i>Fat mass and Obesity associated gene</i> , Gene da massa Gorda associado à obesidade
FZD	Receptores de superfície celular <i>Frizzled</i>
G	Base Guanina ou nucleotídeo desoxiguanilato
G/C (%)	Porcentagem de desoxiguanilato por desoxicitidilato
GCK	<i>Glucokinase gene</i> , Gene da glucoquinase
GCK	Enzima glucoquinase
GCKR	<i>Glucokinase Regulator gene</i> , Gene da proteína reguladora da glucoquinase
GCKRP	<i>Glucokinase Regulatory Protein</i> , Proteína Reguladora da Glucoquinase
GDM	Diabetes mellitus gestacional ou grupo de indivíduos portadores de diabetes gestacional
GHRL	Produto do gene da preprogrelina

GHRL	<i>Ghrelin/Obestatin Prepropeptide gene</i> , Gene do pré-pró-peptídeo Grelina/Obestatina, Gene da preprorelina
GLP-1	<i>Glucagon-Like Peptide 1</i> , Peptídeo 1 Semelhante ao Glucagon
GLU	Glucose
GWAs	<i>Genome-Wide Association studies</i> , Estudos de associação genômica ampla
HAP	Haplótipos
HapMap	<i>International HapMap Project</i> , Projeto Internacional de Mapa de Haplótipos
HbA1C	Hemoglobina glicada
HC-UFPR	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HDL-c	HDL-colesterol
HPM	Hospital da Polícia Militar do Estado do Paraná
HW	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
ID	Idade em anos
IGF2BP2	Insulin-like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2, gene das Proteínas Ligantes do RNA mensageiro do Fator de Crescimento 2 semelhante à Insulina
IMC, BMI	Índice de Massa Corpórea, <i>Body Mass Index</i>
IR	Intervalo de Referência
JAK	<i>Janus kinase</i> , Janus quinase
LC	Localização Cromossômica
LD	<i>Linkage Disequilibrium</i> , Desequilíbrio de Ligação
LDL-c	LDL-colesterol
LEF	<i>Lymphocyte Enhancer transcription Factor</i> , Fator de Transcrição Ativador de Linfócitos
LEP	Leptina
LEP	<i>Leptin gene</i> , gene da Leptina
LEPR	<i>Leptin Receptor</i> , Receptor da Leptina
LEPR	<i>Leptin Receptor gene</i> , gene do Receptor da Leptina
LMC	Laboratório da Prefeitura Municipal de Curitiba
MG	Modelos Genéticos
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i> , Diabetes da Maturidade (do adulto) de início precoce
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i> , Centro Nacional de Informação Biotecnológica ou em Biotecnologia ou NCBI Reference Sequence: NG_011560.1
ND	Informação Não Disponível
NGSP	<i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> , Programa Nacional de Padronização de Hemoglobina Glicada
NIH	<i>National Institutes of Health</i> , Instituto Nacional de Saúde Americano
Ob	Grupo de indivíduos portadores exclusivamente de obesidade
ObT2DM	Grupo de indivíduos portadores de diabetes tipo 2 e obesidade
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> , Herança Mendeliana Humana de acesso Online
OMS, WHO	Organização Mundial de Saúde, <i>World Health Organization</i>

OR	<i>Odds Ratio</i> , Razão de Chance
PARP-1	<i>Poly(ADPribose) polymerase-1</i> , Poli(ADPribose) polimerase-1
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase
PES	Peso em quilogramas
PPARg, PPARy	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i> , Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama.
PPARg2	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma isoform 2</i> , Isoforma 2 do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama
PPARs	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i> , Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma
PPRE	<i>Predicted Peroxisome Proliferator Response Element</i> , Elementos Responsivos Preditos para os Proliferadores de Peroxissomo
PT	Proteína Total
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RAP	Região investigada, amplicons e primers desenhados
RC	Região Cromossômica
RE	Modelo Genético Recessivo
RI	Resistência à Insulina
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> , Fosfatase Alcalina de Camarão
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SLC30A8	<i>Solute Carrier family 30 (zinc transporter), member 8 gene</i> , Gene do Membro 8 da Família 30 de Carreadores de Solutos (Transportador de Zinco)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , Polimorfismo de Único Nucleotídeo
STATs	<i>Signal Transducer and Activators of Transcription Proteins</i> , Proteínas Transdutoras de Sinal e Ativadoras da Transcrição
T	Base Timina ou nucleotídeo desoxitimidilato
T1DM	Diabetes mellitus tipo 1
T2DM	Diabetes mellitus tipo 2
TBE	Tampão composto por Tris, Ácido Bórico e EDTA
TCF-4	<i>Transcription Factor-4</i> , Fator de Transcrição-4
TG	Triglicérides
T _m	Temperatura de <i>melting</i> , temperatura de hibridização/anelamento dos primers
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glucose
TRA	Sítio de Início de Tradução
TSS	<i>Transcription Start Sites</i> , Sítios de Início de Transcrição
U	Base Uracila ou nucleotídeo uridilato
UFPR	Universidade Federal do Paraná
URE	Ureia
UTR	<i>Untranslated Region</i> , Região Não Traduzida
Zn-T8	<i>Zinc Transporter 8</i> , Transportador 8 de Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 JUSTIFICATIVA	19
2.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
4.1 CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	21
4.2 EPIDEMIOLOGIA DO <i>DIABETES MELLITUS</i> E <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2.....	23
4.3 OBESIDADE	24
4.4 GENES ASSOCIADOS AO <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2 E À OBESIDADE	27
4.4.1 <i>PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma)</i>	27
4.4.2 <i>IGF2BP2 (Insulin-like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2)</i>	29
4.4.3 <i>GCK e GCKR (Glucokinase; Glucokinase regulator)</i>	31
4.4.4 <i>TCF7L2 (Transcription Factor 7-Like 2 (T-cell specific, HMG-box))</i>	33
4.4.5 <i>LEP e LEPR (Leptin; Leptin Receptor)</i>	35
4.4.6 <i>SLC30A8 (Solute Carrier family 30 (zinc transporter), member 8)</i>	37
4.4.7 <i>FTO (Fat mass and Obesity associated)</i>	39
4.4.8 <i>GHRL (Preproghrelin, Ghrelin/obestatin prepropeptide)</i>	40
4.4.9 <i>Resumo dos genes investigados</i>	42
5 MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 AMOSTRAS	46
5.2 EXTRAÇÃO DO DNA.....	47
5.3 MÉTODOS UTILIZADOS	48
5.3.1 <i>Reação em cadeia da Polimerase</i>	48
5.3.2 <i>Sequenciamento de DNA</i>	52
5.3.3 <i>Reação de PCR em Tempo Real com Sondas TaqMan®</i>	54
5.4 QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES	56
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E DE <i>SPLICING</i>	56
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1 ANÁLISE DA VARIANTE <i>RS2268574:T>C (GCK, AMPLICON 1) – GDM</i>	58
6.1.1 <i>Parâmetros Antropométricos e Laboratoriais avaliando GDM</i>	59
6.1.2 <i>Análise Molecular I – RS2268574:T>C (GCK) – GDM</i>	62

6.2 ANÁLISE DA VARIANTE <i>rs2268574:T>C</i> (GCK, AMPLICON 2) – T2DM	65
6.2.1 Parâmetros Antropométricos e Laboratoriais avaliando T2DM/Obesidade	65
6.2.2 Análise Molecular II – <i>rs2268574:T>C</i> (GCK) – T2DM/Ob	69
6.3 GENOTIPAGEM POR SONDAS FLUORESCENTES DO TIPO <i>TAQMAN</i> ®	77
6.3.1 Análise geral dos resultados das variantes genotipadas por <i>TaqMan</i> ®	77
6.3.2 Análise dos resultados das variantes genotipadas por modelos genéticos	81
6.3.3 Comparação da frequência do alelo menor dos genes <i>IGF2BP2</i> , <i>GCKR</i> , <i>TCF7L2</i> e <i>SLC30A8</i> com outras populações	84
6.3.4 Análise molecular – Genes <i>IGF2BP2</i> , <i>GCKR</i> , <i>TCF7L2</i> e <i>SLC30A8</i> e associação com o T2DM e Obesidade	85
6.3.5 Comparação da frequência do alelo menor dos genes <i>PPARG</i> , <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> e <i>FTO</i> com outras populações	88
6.3.6 Análise molecular – Genes <i>PPARG</i> , <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> e <i>FTO</i> e associação com o T2DM e Obesidade	90
6.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>GHRL</i> EM INDIVÍDUOS CTRL, ObT2DM E Ob	93
6.4.1 Reação em cadeia da Polimerase e Sequenciamento do gene <i>GHRL</i>	93
6.4.2 Variantes do Amplicon 1 (<i>GHRL A01</i>) do gene <i>GHRL</i>	97
6.4.3 Variante do Amplicon 4 (<i>GHRL A04</i>) do gene <i>GHRL</i>	99
6.4.4 Variante do Amplicon 6 (<i>GHRL A06</i>) do gene <i>GHRL</i>	100
6.4.5 Variantes do Amplicon 9 (<i>GHRL A09</i>) do gene <i>GHRL</i>	101
6.4.6 Variantes do Amplicon 13 (<i>GHRL A13</i>) do gene <i>GHRL</i>	102
6.4.7 Variantes do Amplicon 17 (<i>GHRL A17</i>) do gene <i>GHRL</i>	104
6.4.8 Variante do Amplicon 18 (<i>GHRL A18</i>) do gene <i>GHRL</i>	106
6.4.9 Frequências genotípicas e alélicas das variantes do gene <i>GHRL</i>	107
7 CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS	114
APÊNDICE	129

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM, diabetes) constitui uma síndrome, caracterizada por hiperglicemia crônica, de frequência crescente na população mundial. As causas do DM não são conhecidas, contudo múltiplos fatores estão associados ao diabetes como a falta de hábitos saudáveis de vida, a alimentação hipercalórica que predispõe à obesidade, bem como características genéticas. Estes fatores contribuem de forma significativa para o desenvolvimento, expressão (fenótipo) e severidade da evolução dessa patologia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015b).

As técnicas de mapeamento genético abriram a era da identificação de genes de suscetibilidade às doenças. Um dos tipos mais frequentes de variação genética no genoma humano é representado pelo polimorfismo de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*), o qual contribui para as diferenças inter-individuais em fenótipos complexos. Os estudos para a identificação de *SNPs* e associação com processos patológicos podem contribuir para a identificação da origem ou do mecanismo molecular da susceptibilidade ou mesmo identificar fatores de proteção para doenças. Estes estudos tem potencial para propiciar informação sobre a caracterização diagnóstica acurada e prognóstico da evolução da patologia (STRACHAN; READ, 2013). Estes mesmos autores mencionam também que em futuro previsível, a identificação de genes-alvo associados à processos patológicos podem ser alvos terapêuticos com destaque para a terapia individualizada. Estudos de associação genética envolvendo a detecção de *SNPs* são abordagens eficientes para identificar efeitos moderados destas variações genéticas, em doenças multifatoriais e complexas.

Atrelado ao DM, um fator comum é a obesidade. O sobrepeso e obesidade, medidos pelo Índice de Massa Corpórea (IMC), estão associados ao tipo mais frequente de diabetes, o diabetes tipo 2. Esta relação, reconhecida de longa data, vem acompanhada pelo sedentarismo e maus hábitos alimentares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). No presente, este processo avança, atingindo a população jovem e mesmo crianças em diferentes regiões do mundo, além de fornecer propriedade aos termos “epidemia de diabetes” ou “diabesidade” (diabetes+obesidade). Genes associados tanto ao *Diabetes mellitus*, quanto à

obesidade foram descritos em diferentes populações, porém poucos estudos na população brasileira foram replicados (MCCARTHY, 2010).

Estudar as características genéticas da população brasileira, quanto a genes e seus polimorfismos é relevante. Os padrões de frequências alélicas e genotípicas, observados na população brasileira, podem apresentar significativas divergências com outros estudos realizados, devido às características miscigenadas de nossa população. A mistura de etnias torna estudos de SNPs mais desafiadores.

Esta tese permitiu conhecer melhor o perfil de uma população brasileira quanto aos fatores genéticos associados ao DM e a obesidade. Um perfil da população em estudo quanto aos polimorfismos encontrados, bem como as relações destes com biomarcadores clínicos será relevante para a identificação de novos parâmetros moleculares de risco/proteção associados às patologias em estudo.

2 JUSTIFICATIVA

2.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Um breve resumo dos elementos que caracterizam a relevância desta tese de doutorado se concentra nos seguintes dados:

- O *Diabetes mellitus* ser uma patologia que afeta grande número de indivíduos da população mundial e tem o número de afetados crescente, sendo estimados 11,3 milhões de casos para a população brasileira, no ano 2030 (WILD *et al.*, 2004; MALTA *et al.*, 2014).
- Aproximadamente 50% da população brasileira com diabetes não sabe que são portadores, algumas vezes permanecendo não diagnosticados até que se manifestem sinais de complicações (MALERBI; FRANCO, 1992).
- Os *Diabetes mellitus* tipo 2 tem como fator de risco a obesidade e, na patogênese de ambos, fatores genéticos têm grande relevância (MCCARTHY, 2010; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015b).
- *Diabetes mellitus* tipo 2 tem elevada associação (60% a 90%) com obesidade (FELBER; GOLAY, 2002)
- Poucos estudos populacionais envolvendo variações genéticas associadas ao *Diabetes mellitus* e à obesidade foram conduzidos na população brasileira. Determinar a frequência e perfil polimórfico dos componentes genéticos na população brasileira é relevante para o futuro desenvolvimento de políticas públicas relacionadas ao diabetes e à obesidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar variações genéticas e biomarcadores laboratoriais associados a risco/proteção no *Diabetes mellitus* e suas complicações, na presença e ausência de obesidade em mulheres.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos encontrados nos genes-alvo *PPAR γ* , *IGF2BP2*, *GCKR*, *TCF7L2*, *LEP*, *LEPR*, *SLC30A8* e *FTO* em uma amostra da população brasileira composta por indivíduos saudáveis, diabéticos tipo 2 e obesos.
- Associar as variantes identificadas nos grupos estudados, com características antropométricas, clínicas e biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal.
- Pesquisar variações genéticas do gene da preprogrelina (regiões promotora, exônicas e intrônicas) em amostras de indivíduos saudáveis, em portadores de *Diabetes mellitus* tipo 2 e obesidade utilizando sequenciamento de DNA.
- Buscar associação do polimorfismo *rs2268574:T>C* do gene da Glucoquinase com o *Diabetes mellitus* gestacional e *Diabetes mellitus* tipo 2 em uma amostra da população brasileira, comparando seu efeito nas duas formas de diabetes.

4 REVISÃO DA LITERATURA

O *Diabetes mellitus* (DM, diabetes) é definido pela Associação Americana de Diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015b) não como uma única patologia, mas como um grupo de doenças metabólicas que compartilham a hiperglicemia como fator comum. Esta pode ser resultante de defeitos na secreção da insulina, na ação deste hormônio em células do tecido periférico, ou em ambas as situações. Este mesmo autor ainda menciona que anormalidades no metabolismo dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas nos diabéticos, resultam da ação deficiente da insulina nos tecidos alvos. Além disso, as complicações do DM, em longo prazo, incluem: retinopatia com potencial perda da visão; nefropatia podendo chegar à falência renal; neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés; amputações; doença de *Charcot*; e neuropatia autônoma causando sintomas gastrointestinais, geniturinários e cardiovasculares, além de disfunção sexual.

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2015) portadores de *Diabetes mellitus* podem apresentar uma incidência de doença cardiovascular e cerebrovascular. Além disso, hipertensão e anormalidades no metabolismo lipídico são frequentemente encontradas nesses indivíduos.

Os sinais e sintomas clássicos incluem a hiperglicemia, poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (sede excessiva persistente), perda de peso e em alguns casos, polifagia (fome excessiva) e cetoacidose diabética (FOWLER, 2007). Os sinais e sintomas podem se manifestar com predomínio de alguma destas manifestações de acordo com o tipo de diabetes.

4.1 CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DO *DIABETES MELLITUS*

A classificação com base na etiologia dos tipos de diabetes é amplamente aceita na comunidade científica. Sendo assim, o *Diabetes mellitus* pode ser classificado em quatro grandes categorias ou tipos. Estes podem ser observados de forma mais detalhada no Quadro 1.

QUADRO 1 – PRINCIPAIS TIPOS DE DIABETES, CARACTERÍSTICAS E CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO.

TIPOS DE DIABETES		CARACTERÍSTICAS
<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 (T1DM)		Resultante de uma deficiência absoluta de insulina causada pela destruição autoimune das células-beta pancreáticas (ilhotas de <i>Langerhans</i>). Essa condição foi comumente designada “insulinodependente” ou “diabetes juvenil” no passado. Os subtipos 1A (presença de auto-anticorpos contra estruturas do pâncreas), muito frequente, se contrapõe ao tipo 1B (sem anticorpos) ou idiopático.
<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2 (T2DM)		Causado pela combinação da resistência à insulina e a deficiência na produção deste hormônio, com o aumento da produção hepática de glucose. A obesidade está presente em cerca de ~90% dos portadores desta doença. A obesidade <i>per se</i> causa resistência à insulina. Esta forma de DM foi usualmente designada: “diabetes da maturidade” ou “diabetes não-insulinodependente”.
<i>Diabetes mellitus</i> Gestacional (GDM)		Definido como qualquer grau de intolerância à glucose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez. Guarda similaridades com o T2DM.
Outros tipos específicos de diabetes		São reconhecidos mais de 56 tipos específicos de diabetes. Como principais grupos, destacam-se: os defeitos genéticos na função das células-β pancreática (<i>diabetes tipo MODY, Maturity-Onset Diabetes of the Young</i>); defeitos genéticos que alteram a ação da insulina; doenças do pâncreas; endocrinopatias; indução química ou por drogas; infecções; formas incomuns de diabetes mediados pelo sistema imune; síndromes genéticas associadas ao diabetes em alguns casos.
CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO		
Hemoglobina glicada (HbA1C) ≥ 6,5%:		Aprovado recentemente. O teste deve ser realizado em laboratório utilizando o método certificado e padronizado pelo Programa Nacional de Padronização de Hemoglobina Glicada (NGSP).
Glicemia de Jejum ≥ 126mg/dL (7,0 mmol/L).		O Jejum é definido como nenhuma ingestão caloria por pelo menos 8 horas antes do teste.
Glicemia 2 horas após 75g glucose oral ≥ 200mg/dL (11,1mmol/L)		Após o teste oral de tolerância a glucose (TOTG). Esse teste deve ser executado segundo descrito pela OMS usando o equivalente a 75 g de glucose anidra solubilizada em água.
Glicemia ao acaso 200mg/dL (11,1mmol/L)		Em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crises hiperglicêmicas. Sendo que, na ausência de hiperglicemia inequívoca, os 3 primeiros critérios devem ser confirmados, repetindo-se o teste.

As siglas foram colocadas todas em inglês para padronização e melhor compreensão visto aos artigos publicados/a serem publicados em periódicos internacionais.

Adaptado de *American Diabetes Association* (2015b) e *Standards of medical care in diabetes-2015: summary of revisions* (2015a) com modificações.

Os portadores de T2DM representam mais de 95% do total de diabéticos, tendo detectada esta patologia através de determinações de glicemia associadas à prevenção (testes de triagem) ou de forma esporádica. Isso devido às manifestações, como por exemplo, a redução rápida da acuidade visual, infecções

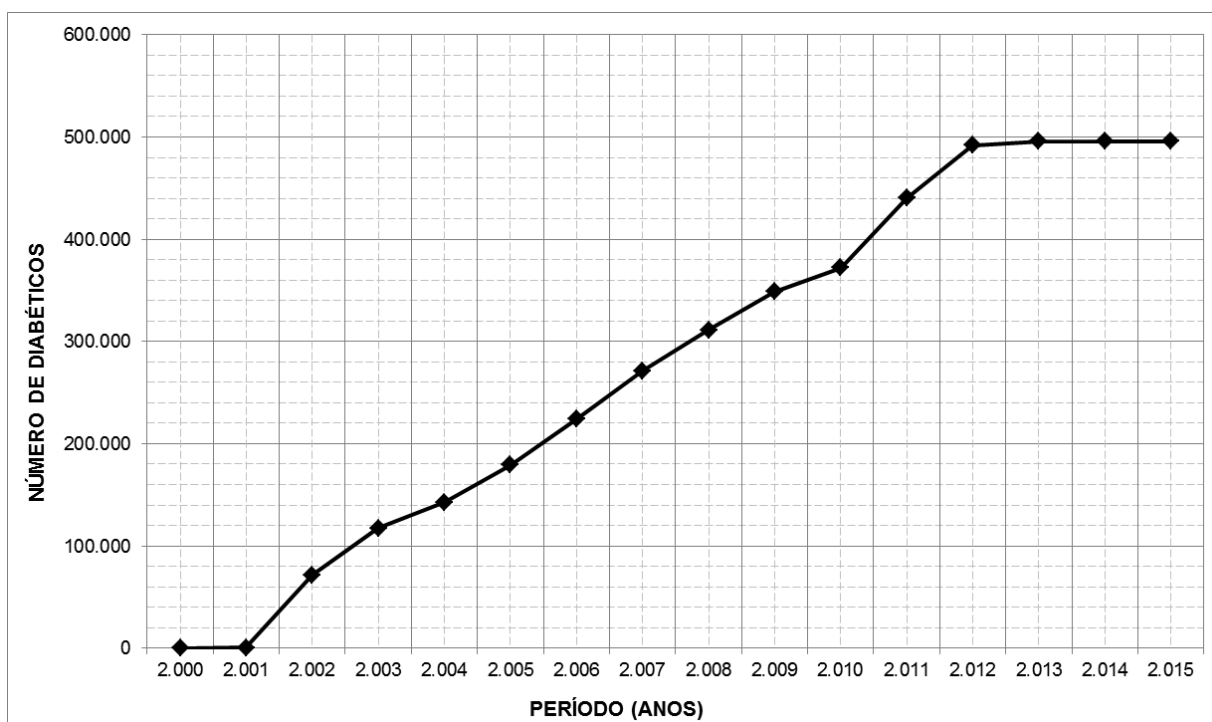
repetidas e a dificuldade na cicatrização de feridas (BEN HAROUSH; YOGEV; HOD, 2004). Essas manifestações, somadas ao aumento expressivo do número de indivíduos que manifestam esta patologia no mundo, torna o DM um problema de saúde pública.

4.2 EPIDEMIOLOGIA DO *DIABETES MELLITUS* E *DIABETES MELLITUS* TIPO 2

Projeções realizadas sobre a expansão do diabetes em escala mundial mostram que o número de afetados por esta patologia poderá dobrar entre os anos 2000 e 2030, passando de 171 milhões em 2000 para 366 milhões em 2030 (WILD *et al.*, 2004).

No final da década de 1980 no Brasil, foi estimada a prevalência do diabetes na população adulta como sendo 7,6% (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015). Também foi mencionado que este índice teria aumentado devido ao crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização, aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo, assim como da maior sobrevida de pacientes com DM. Além disso, a situação fica mais agravante quando se sabe que 46% da população brasileira com diabetes não sabe que são portadores, algumas vezes permanecendo não diagnosticados até que se manifestem sinais de complicações (MALERBI; FRANCO, 1992).

No Brasil, estima-se que poderão haver 11,3 milhões de portadores de diabetes no ano 2.030, representando 2,5 vezes (4,6 milhões) o número de diabéticos reportado para o ano de 2.000 (WILD *et al.*, 2004; MALTA *et al.*, 2014). Em 2015 no Brasil, 495.785 indivíduos adultos foram diagnosticados e catalogados como portadores de diabetes (DATASUS, 2015). A Figura 1 apresenta a evolução do diabetes no Brasil nos últimos quinze anos, aproximadamente.

FIGURA 1 – EVOLUÇÃO ANUAL DO *DIABETES MELLITUS* NO BRASIL.

Para os anos de 2.000 a 2.001, o número de indivíduos catalogados foi 225 e 635, respectivamente. O gráfico reflete os dados de janeiro de 2.000 a agosto de 2015.

Fonte: Adaptado de DATASUS (2015), (<http://hiperdia.datasus.gov.br/hiperelhiperrisco.asp>)

Ainda segundo o DATASUS (2015), dos aproximados 500 mil indivíduos diagnosticados e catalogados como diabéticos, 366.741 são diabéticos tipo 2. Deste número, 154.215 (42,1%) são homens e 212.526 (57,9%) são mulheres.

Embora a etiologia específica do T2DM não seja conhecida, é sabido que a destruição das células-beta pancreáticas não ocorre. Em contrapartida, muitos (mas não todos) os portadores de diabetes tipo 2 apresentam obesidade (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015b).

4.3 OBESIDADE

A obesidade é um mal emergente nos últimos anos. Segundo a Organização Mundial de Saúde, OMS (2015), cerca de três milhões de mortes anuais no planeta estão associadas ao sobrepeso ou à obesidade. O excesso ponderal (de peso, elevado IMC) está relacionado a diferentes alterações metabólicas com destaque para a hipertensão e concentrações séricas elevadas de colesterol e triglicérides,

lípidos associados ao aumento de risco para eventos coronarianos, como o infarto agudo do miocárdio (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2015).

A OMS também relata que a prevalência do sobrepeso e obesidade é maior, para ambos os sexos na América (62%, sobrepeso; 26%, obesidade) e menores no Sudoeste da Ásia (14%, sobrepeso; 3%, obesidade). Tanto nessas regiões quanto na Europa e Leste do mediterrâneo, o número de mulheres obesas é superior ao de homens com este mesmo fator de risco.

A obesidade é definida como uma doença crônica decorrente de um acúmulo excessivo de tecido adiposo em um nível que acaba comprometendo a saúde dos indivíduos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). A obesidade mórbida é definida pelo Instituto Nacional de Saúde americano (NIH) pelo valor de IMC igual ou superior a 40kg/m^2 , assim como igual ou superior a 35kg/m^2 se quaisquer outras doenças associadas à obesidade estiverem presentes (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL, 1991; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

Os afetados pela presença de obesidade visceral (acúmulo de tecido adiposo na região abdominal, alto fator de risco), possuem riscos aumentados de desenvolver diabetes, em especial o do tipo 2 e diabetes gestacional. Em um estudo conduzido por Felber e Golay (2002), 60 a 90% dos indivíduos portadores de diabetes tipos 2 também apresentavam obesidade.

Os critérios para diagnóstico e classificação da obesidade utilizam o peso corporal associado à altura, o Índice de Massa Corpórea (IMC ou BMI em kg/m^2) do indivíduo. Este critério pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1 – DIAGNÓSTICO DA OBESIDADE PELA CLASSIFICAÇÃO DE PESO DE ACORDO COM O IMC E RISCOS.

CLASSIFICAÇÃO	IMC (kg/m^2)	RISCO DE COMORBIDADES
Baixo peso	<18,5	Baixo
Peso normal	18,5-24,9	Médio
Pré-obeso (sobrepeso)	25,0-29,9	Aumentado
Obeso I	30,0-34,9	Moderado
Obeso II	35,0-39,9	Grave
Obeso III	$\geq 40,0$	Muito Grave

Adaptado de Organização Mundial de Saúde (2014), com modificações.

Risco para doenças cardíacas e eventos coronarianos.

Obesidade mórbida, Obeso II (se doenças associadas à obesidade estiverem presentes); Obeso III.

A obesidade também se mostra associada à resistência à insulina (RI) a qual poderá ser de graus variados em cada indivíduo. Embora se considere que a obesidade, simples e *per se*, leva à RI, a distribuição da gordura corporal pode fazer com que a sensibilidade da insulina seja alterada. Indivíduos magros que apresentam uma distribuição mais periférica de gordura são mais sensíveis à insulina (menos resistentes) do que indivíduos magros que possuem gordura distribuída predominantemente na região central, abdômen e tórax (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Outro fator a ser considerado na RI é a hiperinsulinemia.

A hiperinsulinemia é definida como a concentração de insulina de jejum igual ou superior a 95% da encontrada em indivíduos não obesos com tolerância normal à glucose, sem histórico de DM e não usuários de medicação para diabéticos (BURCHFIEL *et al.*, 1998). A concentração de insulina em jejum considerada normal corresponde a valores inferiores a 25 mU/L ou 174pmol/L (MELMED *et al.*, 2011).

Embora seja considerada como resultante da RI, concentrações elevadas de insulina plasmática também podem levar ao desenvolvimento da RI, em especial se ácidos graxos livres estiverem presentes (YE, 2007). A hiperinsulinemia representa um esforço realizado pelo organismo para prevenir a hiperglicemia (YE, 2007). A hiperinsulinemia é decorrente tanto da produção em excesso da insulina quanto de sua depuração renal diminuída. Além disso, a passagem de um indivíduo do estado saudável para o obeso faz com que o número de células-beta pancreáticas aumente devido ao ganho de massa, assim como a função dessas células. Estas mudanças que ocorrem nas células-beta são estimuladas pelo aumento da glucose e de ácidos graxos (YE, 2007; CORKEY, 2012; YE, 2013).

A hiperinsulinemia também pode ter como causa a resistência desenvolvida pelas células-beta pancreáticas em responder ao hormônio leptina, já que este, em condições fisiológicas normais, sinaliza para as células-beta não produzam insulina (ZHAO, A. Z.; BORNFELDT; BEAVO, 1998; GRAY *et al.*, 2010). Segundo Gray e colaboradores (2010) camundongos que tiveram, no pâncreas, o receptor pancreático da leptina silenciado, apresentaram em um primeiro momento hiperinsulinemia e após resistência à insulina. Além disso, quando tanto camundongos quanto humanos foram tratados com doses elevadas de insulina, ambos manifestaram hiperinsulinemia e resistência à insulina (SHANIK *et al.*, 2008).

Também é sabido que, em indivíduos obesos, o tecido adiposo secreta grande quantidade de ácidos graxos não esterificados (ácidos graxos livres),

citocinas pró-inflamatórias, glicerol e hormônios que também contribuem para o desenvolvimento da RI. Diante disso, a obesidade tem sido associada com a resistência à insulina e com o *Diabetes mellitus* tipo 2 (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Alguns genes já foram associados tanto com o desenvolvimento do diabetes tipo 2 quanto com a obesidade (MCCARTHY, 2010).

4.4 GENES ASSOCIADOS AO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2 E À OBESIDADE

O *Diabetes mellitus* tipo 2 é uma desordem metabólica multifatorial na qual tanto fatores genéticos quanto a obesidade contribuem para o seu desenvolvimento (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2015b). Dentre diversos outros reportados, os genes: Receptores gamma Ativados por Proliferadores de Peroxissomo (*PPARg*), Proteína 2 Ligante de mRNA do Fator de Crescimento 2 Semelhante à Insulina (*IGF2BP2*), Glucoquinase (*GCK*), Proteína Reguladora da Glucoquinase (*GCKR*), Fator de Transcrição 7 semelhante ao 2 de Células-T Específicas (*TCF7L2*), Leptina (*LEP*), Receptor da Leptina (*LEPR*), Membro 8 da Família 30 dos Carreadores de Solute (*SLC30A8*), Massa Gorda associada à obesidade (*FTO*) e Preprogrelina (*GHRL*) estão entre os mais estudados no diabetes tipo 2 e na obesidade (MCCARTHY, 2010).

4.4.1 *PPARg (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma)*

O gene que codifica o receptor *PPARg* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma [Homo sapiens (human)] gene; PPARg; NCBI Reference Sequence: NG_011749.1, OMIM: 601487*) encontra-se no cromossomo 3, na região 3p25, possui 153.507pb e contém 10 éxons. Qualquer variação genética que afete a estrutura do produto deste gene pode comprometer sua ação.

O *PPARg* é um receptor hormonal (Ex.: tireoidianos) localizado no núcleo que é expresso, preferencialmente, em células do tecido adiposo (SPIEGELMAN, 1998). Este receptor hormonal é um regulador essencial para o metabolismo de lipídeos, homeostase da glucose e sensibilidade à insulina (LATRUFFE; VAMECQ, 1997; ROSEN; SPIEGELMAN, 2001).

Tanto em camundongos quanto em humanos ele pode ser encontrado expresso em duas isoformas diferentes, PPARg1 e PPARg2. Esta difere da primeira nos 30 aminoácidos adicionais em sua região N-terminal. A isoforma PPARg2 também participa como principal reguladora na formação de adipócitos, está associada ao acúmulo de tecido adiposo e contribui para o desenvolvimento da obesidade (ZHU *et al.*, 1995; LEHRKE; LAZAR, 2005).

Este receptor, quando ativado, induz a transcrição de genes que promovem a diferenciação dos adipócitos e aumento da sensibilidade à insulina (FLOREZ *et al.*, 2007). Embora a isoforma PPARg2 seja pouco expressa (5-10%) no tecido muscular, ela *per se* é suficiente para induzir a adipogênese. Além disso, foi reportado que sua ausência nos músculos pode levar à resistência à insulina de forma severa, embora possa afetar de forma branda o tecido adiposo e o fígado (BOWEN *et al.*, 1991; LOVISCACH *et al.*, 2000; HEVENER *et al.*, 2003). Mesmo tendo baixa expressão nos músculos, o PPARg2 atua como um sensor molecular controlando o metabolismo e transportando ácidos graxos. Além disso, atua como modulador da via de sinalização da insulina por aumentar a sensibilidade do músculo esquelético e fígado para a ação este hormônio (MACIEJEWSKA-KARLOWSKA, 2013).

O polimorfismo *rs1801282:C>G* (*P12A*), foi associado ao diabetes tipo 2, nefropatia e elevação do IMC (ALTSHULER *et al.*, 2000; LAPICE *et al.*, 2010). Este polimorfismo, primeiramente descrito em 1997, é caracterizado como uma mutação *missense* (CCA>GCA) localizada no códon 12 (*C34G*) do éxon B do gene *PPARg*. Este éxon codifica para resíduos de aminoácidos N-terminais que definem a isoforma PPARg2 específica de adipócitos (YEN *et al.*, 1997; STUMVOLL; HARING, 2002). O alelo-G do polimorfismo *rs1801282:C>G* tem se mostrado associado à uma substancial melhora da sensibilidade à insulina em humano (STUMVOLL; HARING, 2002). Seu mecanismo é baseado em sua ação em elementos responsivos.

A troca de uma prolina (apolar e cíclico) para uma alanina (apolar acíclico) reduz a afinidade de ligação do PPARg2 por elementos responsivos no DNA. A relevância funcional dessa troca de aminoácido nesta isoforma é resultado de sua localização na molécula (MACIEJEWSKA-KARLOWSKA, 2013). Os elementos responsivos, denominados sequências PPRE (*Predicted Peroxisome Proliferator Response Element*), podem ser encontrados próximos a genes-alvo. Dessa forma, como a afinidade de ligação do PPARg2 por esses elementos está diminuída devido

ao polimorfismo, a ativação dos genes-alvo também acaba sendo reduzida (DEEB *et al.*, 1998; MASUGI *et al.*, 2000). Não obstante a isso, a PPAR γ 2 mutada apresenta dificuldade de realizar heterodimerização com o receptor X do ácido retinóico (outro fator de transcrição), o que também não contribui para a ativação da transcrição dos numerosos genes-alvo que controlam o metabolismo (SPIEGELMAN, 1998; STUMVOLL; HARING, 2002).

Informações complementares

Os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomo (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*, PPARs), descritos pela primeira vez em 1990, são classificados como fatores ativadores de transcrição, por meio de ligantes, pertencentes à família de receptores hormonais nucleares (ISSEMAN; GREEN, 1990; YESSOUFOU; WAHLI, 2010; LEHNINGER; NELSON; COX, 2013). Estes desempenham função relevante no metabolismo, em especial, no metabolismo de lipídeos (LATRUFFE; VAMECQ, 1997). Segundo Tavares e colaboradores (2007), os PPARs são membros pertencentes à subfamília de receptores que incluem o receptor do hormônio da tireoide, receptor do ácido retinóico e o receptor da vitamina D3. Estes mesmo autores também mencionam que, estruturalmente, são três proteínas distintas (PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ (PPAR γ)) codificadas por genes diferentes que constituem a família dos receptores PPARs. Embora não completamente elucidado, é reconhecido que cada uma delas apresenta mecanismo distinto ao exercerem seus efeitos em sítios-alvo como o fígado, pâncreas, tecido adiposo e músculo (YESSOUFOU; WAHLI, 2010). Além disso, como são fatores de transcrição, atuam na regulação da expressão de centenas de genes-alvo. Entre os três tipos de PPARs, o PPAR γ tem sido associado à obesidade (ZHOU *et al.*, 2014).

4.4.2 IGF2BP2 (*Insulin-like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2*)

O gene *IGF2BP2* (*Insulin-like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2* [*Homo sapiens (human)*], gene codificador da proteína 2 ligante do mRNA do fator de crescimento 2 semelhante à insulina, OMIM: 608289) está localizado no cromossomo 3, na região 3q27.2, possui 181.301pb e contém 16 éxons (NCBI

Reference Sequence: NG_011602.1). O gene *IGF2BP2* também é conhecido como *IMP2*, já que codifica para uma proteína denominada IMP2 que controla o mecanismo do fator de crescimento 2 semelhante à insulina (*IGF2, insulin-like growth factor 2*). A importância deste gene na proliferação e diferenciação celular, além do estímulo à ação da insulina tem sido descrita (CHRISTIANSEN *et al.*, 2009).

Variações genéticas que afetam a função ou regulação do *IGF2BP2* têm sido associadas com o comprometimento da função da célula-beta pancreática e secreção de insulina estimulada pela glucose (JIA *et al.*, 2011). Além disso, como o *IGF2BP2* está envolvido na proliferação e diferenciação celular e estímulo da ação da insulina qualquer defeito nesse mecanismo pode estimular o desenvolvimento do diabetes, em especial o diabetes tipo 2 (ZEGGINI, 2007).

O *IGF2BP2* humano dá origem à proteína IMP2 por um processo de *splicing* o qual retira no mRNA a região correspondente ao éxon 10 desse gene. Além disso, no intron 2 (o maior) está localizado o polimorfismo *rs4402960:G>T*. Embora esta variante ainda não tenha seu mecanismo elucidado, tem sido associada ao T2DM em estudos GWAs (CHRISTIANSEN *et al.*, 2009).

Informações complementares

As proteínas ligantes do RNA mensageiro do fator de crescimento 2 semelhante à insulina fazem parte de uma família de proteínas ligantes (IMPs: IMP1, IMP2 e IMP3) de RNA mensageiro que controlam sua localização, estabilidade e tradução (CHRISTIANSEN *et al.*, 2009). As IMPs se ligam na porção 5' UTR (*Untranslated Region*, região não traduzida) do mRNA do IGF2 regulando a tradução deste fator (ZEGGINI, 2007; CHRISTIANSEN *et al.*, 2009). As IMPs são frequentemente encontradas no citoplasma, embora migrem do núcleo ligadas com RNAs mensageiros-alvo, facilitando o transporte destes transcritos do núcleo para o citoplasma (NIELSEN *et al.*, 2003; OLEYNIKOV; SINGER, 2003).

Os RNAs mensageiros que dão origem às IMPs são encontrados em diversos órgãos no período pré-natal. Porém apenas o mRNA da IMP2 pode ser encontrado no cérebro, intestino, medula óssea, rins, fígado, músculos, pulmões, testículos e no pâncreas (tanto em camundongos quanto em humanos) de adultos (GU; SHIGEMASA; OHAMA, 2004; HAMMER *et al.*, 2005; CHRISTIANSEN *et al.*, 2009).

Estudos de associação genômica ampla (*Genome-Wide Association studies*, GWAs) mostraram a associação de IMP2 com o *Diabetes mellitus* tipo 2 (CHRISTIANSEN *et al.*, 2009). Isso porque as IMP2 foram associadas com a redução tanto da função da célula-beta pancreática, quanto da sensibilidade à insulina das concentrações de glucose no jejum (GRARUP *et al.*, 2007; GROENEWOUD *et al.*, 2008; LYSSENKO *et al.*, 2008; PALMER *et al.*, 2008).

4.4.3 GCK e GCKR (*Glucokinase; Glucokinase regulator*)

A GCK é codificada pelo gene *GCK (Glucokinase (hexokinase 4) [Homo sapiens (human)]*, OMIM: 138079). Este está localizado no cromossomo 7, na região 7p15.3-p15.1, possui 45.153pb e contém 10 éxons (NCBI Reference Sequence: NG_008847.1).

A GCKRP é codificada pelo gene *GCKR (Glucokinase (hexokinase 4) regulator [Homo sapiens (human)]*, OMIM: 600842). Este está localizado no cromossomo 2, na região 2p23, possui 26.848pb e contém 19 éxons (NCBI Reference Sequence: NG_028024.1).

Visto que os genes *GCK* e *GCKR* controlam o metabolismo dos carboidratos, polimorfismos têm sido reportados associados com o diabetes, em especial com o diabetes tipo 2. Uma meta-análise conduzida por Fu e colaboradores (2013) analisando 298.468 indivíduos, considerou o polimorfismo -30G>A (*GCK*) um fator de risco para o aumento da susceptibilidade do desenvolvimento do T2DM, embora essa associação dependa da etnia da população estudada. O alelo-*T* da variante *rs780094:C>T (GCKR)* foi associada como risco reduzido para o T2DM em chineses Han e com aumento da glicemia de jejum (alelo-*C*) em mulheres chinesas (QI *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2011).

Informações complementares

A glucoquinase (*GCK*, HK-IV, HK-D), ATP:D-hexose 6-fosfotransferase, ou ainda, hexoquinase do tipo IV, é a uma enzima monomérica que catalisa a reação de fosforilação da glucose tanto nas células-beta pancreáticas quanto nos hepatócitos de mamíferos (IYNEDJIAN, 1993; TAKEDA *et al.*, 1993).

Esta enzima possui uma massa molecular de 51.919Da, enquanto que outras hexoquinases possuem, aproximadamente, o dobro de seu tamanho (IYNEDJIAN, 1993). A grande homologia desta enzima com as outras hexoquinase se justifica por uma possível duplicação do gene da glucoquinase em um ancestral distante que daria origem ao gene das outras hexoquinases. Além disso, a GCK apresenta uma menor afinidade pela glucose quando esta se encontra em concentração fisiológica entre 5 a 7mMol/L quando comparada às outras hexoquinases (DE LA IGLESIA *et al.*, 1999; BALTRUSCH; TIEDGE, 2006).

A glucoquinase possui três isoformas. A primeira é conhecida como isoforma pancreática. Possui 465 aminoácidos com sua porção N-terminal contendo 15 aminoácidos. A segunda e a terceira isoforma (466 e 464 aminoácidos), ambas são conhecidas como hepáticas e apresentam 16 e 14 aminoácidos respectivamente em suas porções N-terminais (MAGNUSON; SHELTON, 1989).

A GCK não é inibida pelas concentrações fisiológicas de glucose 6-fosfato, diferentemente das outras hexoquinases. Estas se encontram distribuídas nas células de diferentes tecidos dos mamíferos e catalisam, em um processo dependente de ATP, a primeira etapa do metabolismo da glucose, convertendo-a em glucose 6-fosfato (RUZZO; ANDREONI; MAGNANI, 1998).

A glucoquinase apresenta dupla função, conforme proposto por Matschinsky e Ellerman (1968). Ela i) catalisa a reação de fosforilação da glucose nas células-beta pancreáticas e nos hepatócitos de mamíferos e ii) serve como um “sensor” deste monossacarídeo para a secreção de insulina pelo pâncreas. Dessa forma, esta enzima contribui na regulação do metabolismo da glucose (MATSCHINSKY, F. M.; ELLERMAN, 1968; MATSCHINSKY, F. M.; *et al.*, 2006).

A atividade catalítica da glucoquinase é regulada por uma proteína de 68kDa denominada Proteína Reguladora da Glucoquinase (GCKRP) no núcleo dos hepatócitos (DE LA IGLESIA *et al.*, 1999). Quando a GCKRP está ligada à GCK, esta se mantém inativa. Porém, a elevação da glicemia faz com que a GCKRP se desligue da GCK. Esta, agora na forma ativa, migra para o citoplasma e fosforila a glucose internalizada para que esta seja consumida na via glicolítica. Após desempenhar sua função, a GCK retorna à forma inativa ao se ligar novamente à GCKRP (ARDEN *et al.*, 2004).

Além da concentração de glucose, as de frutose 1-fosfato e frutose 6-fosfato, no meio intracelular, também são importantes neste mecanismo de

ativação/inativação. No fígado, concentrações aumentadas de frutose 1-fosfato favorecem o desligamento do complexo GCKRP/GCK (ativação) enquanto que o aumento de frutose 6-fosfato promove o inverso (VAN SCHAFTINGEN; VEIGA-DA-CUNHA; NICULESCU, 1997). Isso por causa de um mecanismo paralelo à via glicolítica realizado pela enzima frutoquinase. Esta adiciona um grupo fosfato no carbono de número 1 da frutose transformando-a em frutose 1-fosfato. Quando as concentrações de glucose e frutose 1-fosfato se elevam no citoplasma do hepatócito, a alta afinidade da GCKRP pela frutose 1-fosfato faz com que esta enzima se desligue da GCK, ativando-a. Por um mecanismo catalítico reversível, em condições fisiológicas, a enzima fosfohexose-isomerase converte a glucose 6-fosfato, gerada em excesso pela GCK, em frutose 6-fosfato. Esta pode ser consumida na via glicolítica para também gerar energia ou, quando em excesso, inibe a GCK (VAN SCHAFTINGEN; VEIGA DA CUNHA; NICULESCU, 1997; AGIUS; STUBBS, 2000; ARDEN *et al.*, 2004; LEHNINGER; NELSON; COX, 2013).

4.4.4 TCF7L2 (*Transcription Factor 7-Like 2 (T-cell specific, HMG-box)*)

O gene *TCF7L2* (*Transcription Factor 7-Like 2 (T-cell specific, HMG-box)*), fator de transcrição 7 semelhante ao 2, OMIM: 602228) está localizado no cromossomo 10, na região 10q25.3, possui 217.429pb e contém 20 éxons (NCBI Reference Sequence: NG_012631.1). Este gene apresenta funções importantes para a sobrevivência da célula-beta pancreática como sua multiplicação e secreção de insulina sob estímulo de glucose e incretinas (SHU *et al.*, 2008).

O *TCF7L2* codifica o fator de transcrição 4 (TCF-4, *transcription fator-4*) de células-T humanas que atua na cascata de sinalização mediada por proteínas *Wnt* (por favor, ver o tópico “informações complementares” deste gene). O TCF-4 regula a transcrição, nas células enteroendócrinas, do gene proglucagon o qual é responsável por codificar o hormônio insulínico denominado peptídeo 1 semelhante ao glucagon (*Glucagon-Like Peptide 1*, GLP-1). Este hormônio exerce efeitos na homeostase da glucose, podendo diminuir os níveis deste carboidrato por meio do estímulo da síntese e secreção da insulina, inibição da liberação do glucagon e do esvaziamento gástrico (RAITAKARI *et al.*, 2007).

Variações genéticas que afetem a estrutura do gene *TCF7L2* e, consequentemente, o TCF-4 podem comprometer esta sinalização. Dentre vários polimorfismos estudados nesse gene, o *rs7901695:C>T* é um dos mais estudados. Embora não seja sabido o mecanismo de como esta variante intrônica desempenha seu efeito, esta variação genética tem sido associada com o *Diabetes mellitus* tipo 2 em diferentes populações (BONETTI *et al.*, 2011; GUINAN, 2012; KALNINA *et al.*, 2012).

Informações complementares

O gene *TCF7L2* apresenta seu produto (fator de transcrição 4) compartilhado com uma via de sinalização paralela a qual é mediada por glicoproteínas Wnt. Estas são moléculas sinalizadoras secretadas por diversas células e atuam como mediadores químicos controlando o desenvolvimento de muitos tipos celulares (LOGAN; NUSSE, 2004; CLEVERS, 2006). Em um estudo avaliando o desenvolvimento de tumores de mama em camundongos, Nusse e Vermus (1982) descobriram o primeiro gene responsável por codificar essas glicoproteínas, o proto-oncogene *Int1*. Pelo fato deste gene codificar uma proteína com sequência de aminoácidos muito similar à codificada pelo gene *Wingless* (*Wg*, morfogênese das asas de *Drosophila*), passou a ser chamado de *Wnt-1* (RIJSEWIJK *et al.*, 1987). Até o momento, 19 genes Wnt foram identificados em humanos e em camundongos (IP; CHIANG; JIN, 2012).

Estruturalmente, as Wnt são proteínas diferentes das simples. Elas possuem uma cadeia de ácido graxo ligada, covalentemente, em sua porção N-terminal responsável por aumentar a adesão na superfície celular (ALBERTS; WILSON; HUNT, 2008). Além disso, possuem afinidade tanto pelos receptores pertencentes à família de receptores de superfície celular Frizzled (FZD), os quais apresentam 7 domínios transmembrana, quanto pelo co-receptor LRP5/6 (*Lowdensity lipoprotein receptor-related protein 5 or 6*), proteína co-receptora 5 ou 6 para lipoproteínas de baixo peso molecular (IP; CHIANG; JIN, 2012).

Quando as proteínas Wnt ativam receptores FZD e LRP5/6, estes recrutam a proteína de ancoragem Dishevelled, a qual tem a função de transmitir o sinal para a via Wnt/ β -catenina (via canônica). A β -catenina (β -cat) é uma proteína multifuncional que participa tanto no processo de adesão celular quanto na regulação gênica

(ALBERTS; WILSON; HUNT, 2008). Além disso, ela apresenta função crucial como regulador da adipogênese (ARANGO *et al.*, 2005).

O mecanismo de transcrição pela via canônica (com participação da β -cat) apresenta fatores de transcrição. Estes são proteínas ou complexos proteicos os quais regulam a transcrição de genes específicos (KORINEK *et al.*, 1998; PRUNIER; HOCEVAR; HOWE, 2004; IDOGAWA *et al.*, 2005; SHITASHIGE; HIROHASHI; YAMADA, 2008).

A formação deste complexo transcricional, dependente da β -catenina, induz a transcrição de genes-alvo que, por exemplo, inibem a diferenciação dos pré-adipócitos ou a adipogênese (PRESTWICH; MACDOUGALD, 2007). Além disso, é sabido que mais de 60 diferentes genes têm sua transcrição estimulada pela β -cat. Além disso, o aumento da atividade transcricional também está associado à maior liberação de GLP-1 pelas células-L intestinais endócrinas (SMITH, 2007). Dessa forma, qualquer alteração na via Wnt, como por variações genéticas no gene *TCF7L2*, pode diminuir a produção de GLP-1 e este poderá afetar a secreção da insulina de forma direta ou de indireta por também comprometer a produção das células-beta pancreáticas.

4.4.5 LEP e LEPR (Leptin; Leptin Receptor)

A leptina (LEP), do grego “*leptos*” (fino), possui 167 resíduos de aminoácidos (PARACCHINI; PEDOTTI; TAIOLI, 2005). Esta proteína é codificada pelo gene *LEP* (*Leptin [Homo sapiens (human)]*, OMIM: 164160), inicialmente denominado *Ob* (obesidade). O gene *LEP* está localizado no cromossomo 7, na região 7q31.3, possui 16.352pb e contém 3 éxons (NCBI Reference Sequence: NG_007450.1).

O receptor da leptina (LEPR), apresenta estrutura semelhante à de receptores da família de receptores de classe 1 de citocina (TARTAGLIA *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1996). Este receptor é codificado pelo gene *LEPR* (*Leptin Receptor [Homo sapiens (human)]*, OMIM: 601007) e inicialmente foi denominado *DB*, diabético. O gene *LEPR* está localizado no cromossomo 1, na região 1p31, possui 216.842pb e contém 24 éxons (NCBI Reference Sequence: NG_015831.2).

Como a leptina e seu receptor controlam o balanço energético, variações genéticas que afetem a proteína ou sítios de sinalização podem influenciar este

mecanismo. O alelo-A do polimorfismo *rs7799039:G>A* (G-2548A), localizado na região promotora do gene *LEP*, foi associado ao risco para sobrepeso e obesidade em adolescentes da Malásia do sexo masculino (NG *et al.*, 2014).

Duas variantes do *LEPR* codificam para aminoácidos localizados em regiões altamente conservadas da proteína do receptor da leptina (*K109R*, *rs1137100:A>G* e *Q223R*, *rs1137101:A>G*). Estas possuem potencial para afetar a estrutura do LEPR e podem levar a uma ineficaz transdução no mecanismo de sinalização que este receptor promove em nível intracelular. Dessa forma, podem fazer com que o indivíduo desenvolva o diabetes tipo 2 por meio da obesidade (SALOPURO *et al.*, 2005; HEBER; CARPENTER, 2011).

Informações complementares

A leptina é um hormônio produzido pelos adipócitos e atua como uma molécula sinalizadora na regulação, por *feedback* negativo, da massa corpórea pelo tecido adiposo (OSWAL; YEO, 2010). Ao chegar ao cérebro, através da corrente sanguínea, age nos receptores hipotalâmicos promovendo a redução do apetite, aumento de temperatura (estímulo do gasto energético), a perda de massa corpórea, além de estimular o sistema nervoso simpático (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013). A leptina atua em diferentes locais no corpo humano como glândulas mamárias, tecido ósseo, fígado, rins e órgãos reprodutores (BARATTA, 2002). Devido ao seu mecanismo e locais de ação, um estado severo de obesidade pode estar associado a sua falta, e esta a um defeito em sua produção (PARACCHINI; PEDOTTI; TAIOLI, 2005). Embora a falta de leptina na corrente sanguínea (assim como quaisquer irregularidades em sua ação) esteja associada à obesidade, ainda há questões a serem elucidadas. Paradoxalmente, em alguns estudos pôde ser observada uma elevada concentração deste hormônio na corrente sanguínea de indivíduos obesos (CONSIDINE *et al.*, 1995; CARO *et al.*, 1996; HASSINK *et al.*, 1996). A leptina apresenta seu mecanismo de ação, quando ligada em seu receptor, o LEPR. Quando a leptina se liga a este receptor no meio extracelular, este sofre dimerização e sucessivos eventos de sinalização ocorrem no interior da célula. No meio intracelular, a enzima Janus quinase (JAK) participa deste mecanismo de sinalização ao fosforilar resíduos do aminoácido tirosina de cada monômero do LEPR. As proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição (STATs 3, 5 e

6, ou lipo-STATS) se ancoram aos resíduos de tirosina para serem fosforiladas, também, pela JAK. Após a reação catalítica da JAK, as STATS migram em direção ao núcleo para se ligarem em sequências específicas e estimularem a expressão de genes-alvo cuja regulação se dá pela leptina (WAUMAN; TAVERNIER, 2011; LEHNINGER; NELSON; COX, 2013).

4.4.6 SLC30A8 (*Solute Carrier family 30 (zinc transporter), member 8*)

O gene *SLC30A8 (Solute Carrier family 30 (zinc transporter), member 8 [Homo sapiens (human)], OMIM: 611145)* está localizado no cromossomo 8, na região 8q24.11, possui 226.442pb e contém 11 éxons (*NCBI Reference Sequence: NG_016991.1*). Este gene codifica para o transportador de zinco 8 (Zn-T8).

O Zn-T8 é uma proteína, composta por seis domínios transmembrana, constituída de 369 resíduos de aminoácidos. Este transportador de zinco é encontrado expresso predominantemente nas vesículas secretoras de insulina das células-beta pancreáticas (CHIMIENTI *et al.*, 2004), embora tenha sido também identificado nos rins e testículos em menor quantidade (NISHIMURA; NAITO, 2008).

Expressão aumentada de Zn-T8 em células INS-1 (secretam insulina em resposta à glucose em concentrações fisiológicas) melhorou a secreção de insulina estimulada por aquele monossacarídeo. Além disso, a regulação negativa da expressão deste receptor mostrou um teor reduzido de insulina secretada após uma resposta a um estímulo hiperglicêmico (CHIMIENTI *et al.*, 2006; FU, Y. *et al.*, 2009).

Defeitos neste transportador de zinco, dentre eles aqueles ocasionados por polimorfismos, têm sido associados tanto com diabetes tipo 1 quanto com o tipo 2. Além disso, foi reportado que diversos estudos GWAs mostraram a associação do Zn-T8 especialmente com o diabetes tipo 2 (MYERS; NIELD; MYERS, 2012).

O polimorfismo não-sinônimo *rs13266634:C>T (R325W)* do gene *SLC30A8* foi sugerido como patogênico por afetar a conversão de pro-insulina em insulina, ocasionando a redução da secreção deste hormônio (STAIGER *et al.*, 2007). Essa associação com problemas no estágio final da secreção da insulina no interior das vesículas das células-beta pancreáticas também foi observada por Sladek e colaboradores (2007). Portadores do alelo *R-325* podem ter o risco aumentado para o desenvolvimento do diabetes tipo 2, uma vez que a alteração da estrutura do Zn-

T8 pode comprometer metabolismo da insulina (NICOLSON *et al.*, 2009). Boesgaard e colaboradores (2008) reportaram que indivíduos homozigóticos (CC) para o alelo *R*-325 foram associados com um aumento de 43% no risco de desenvolver diabetes. Esta variante foi reportada como um dos os marcadores genéticos para o T2DM mais comuns já confirmados nas populações europeia e leste-asiática (CAUCHI *et al.*, 2010).

Informações complementares

O cátion zinco (Zn^{2+}) é um elemento essencial para as funções fisiológicas normais e homeostase celular (MYERS; NIELD; MYERS, 2012). Dentre as principais funções biológicas do zinco estão i) catalítica, ii) estrutural e iii) regulatória (CHASAPIS *et al.*, 2012). Este cátion é constituinte de diversas proteínas, enzimas, receptores, fatores de crescimento, citocinas e fatores de transcrição. Participa também como cofator de aproximadamente 3.000 proteínas humanas/enzimas, fatores nucleares e hormônios (ANDREINI *et al.*, 2006; FUKADA *et al.*, 2011).

Em 1.934 foi proposto este íon como sendo essencial para a cristalização da insulina (SCOTT, 1934). Esta é armazenada na forma hexamérica dentro das vesículas secretoras nas células-beta pancreáticas, necessitando também de íons zinco para sua secreção (CHAUSMER, 1998; CHIMIENTI *et al.*, 2004).

Conforme a síntese de insulina aumenta nas vesículas, seus monômeros tendem a formar dímeros. Estes, na presença de íons zinco (cerca de 10 mM) e pH favorável (valores em torno de 6), formam hexâmeros. O monômero é a forma ativa da insulina, enquanto que o hexâmero é a forma na qual este hormônio é armazenado (CHIEN, 1996; FU, Z.; GILBERT; LIU, 2013). A presença de dois Zn^{2+} , localizados no centro do hexâmero de insulina coordenados com resíduos HisB10 (posição 10 da cadeia B da insulina) e GluB13 (posição 13 da cadeia B da insulina), é considerada essencial para o processamento normal e cristalização de insulina e consequentemente a secreção (NICOLSON *et al.*, 2009; FAGHIH *et al.*, 2014).

Um dos principais componentes que contribuem para a homeostase do Zn^{2+} é seu transportador. Os transportadores de zinco são membros da família ZiP ou ZnT. Os primeiros facilitam o influxo de íons zinco para o citoplasma a partir do exterior da célula. Os últimos permitem o transporte de Zn^{2+} para organelas intracelulares e

vesículas secretoras de insulina. Dessa forma, ambos contribuem para manter a homeostase de íons zinco em nível celular (MYERS; NIELD; MYERS, 2012).

4.4.7 FTO (*Fat mass and Obesity associated*)

A enzima 2-oxoglutarato ácido nucleico-dependente desmetilase é produto do gene *FTO* (*Fat mass and Obesity associated [Homo sapiens (human)]*, OMIM: 610966). Este gene está localizado no cromossomo 16, na região 16q12.2, possui 410.505pb e contém 9 éxons (NCBI Reference Sequence: NG_012969.1). De acordo com Hotta et al. (2008), o mecanismo preciso, por meio do qual o gene *FTO* promove o desenvolvimento da obesidade não é claro. No entanto, estes mesmos autores salientam que este gene é regulado pelo jejum e pela leptina.

Estudos reportam que variantes no gene *FTO* foram significativamente associadas à obesidade em populações de origem europeia. Além disso, os polimorfismos em íntrons foram os mais associados com a obesidade, pois foi sugerido essas variações genéticas podem alterar a expressão do mRNA do gene *FTO* (GERKEN et al., 2007; LI, H. et al., 2008). As variantes intrônicas *rs1421085:T>C*, *rs8050136:C>A* e *rs9930506:A>G* foram associadas com a obesidade e/ou com T2DM.

O polimorfismo *rs1421085:T>C* foi fortemente associado com a obesidade ($P=3,04 \times 10^{-10}$, OR = 1,75, IC = 1,47-2,08) em um estudo caso-controle composto por mulheres com IMC > 35 kg/m² (PRICE; LI; ZHAO, 2008).

A variante *rs8050136:C>A*, considerada tagging-SNP para a obesidade infantil em caucasianos (GRANT et al., 2008), também foi associada ao diabetes tipo 2 e obesidade em asiáticos (LIU et al., 2010).

A variação genética *rs9930506:A>G*, recentemente, foi associada com o aumento do IMC. Além disso, embora localizada no gene *FTO*, foi reportada correlacionada não com a expressão deste, mas sim com a expressão aumentada do gene vizinho *iroquois homeobox 3* [*Homo sapiens (human)*], *IRX3* (SMEMO et al., 2014; TUNG et al., 2014).

Informações complementares

A enzima 2-oxoglutarato ácido nucleico-dependente desmetilase realiza a desmetilação tanto do DNA quanto do RNA e regula a transcrição de genes envolvidos no balanço energético. Esta enzima apresenta dupla cadeia beta-hélice (DSBH) e homologia com enzimas Fe(II)- e 2-oxoglutarato oxigenases (2OG) (GERKEN *et al.*, 2007). O domínio da DSBH dessa proteína possui 4 resíduos conservados semelhantes às enzimas Fe(II), além de sítios de ligação semelhantes quando comparado às 2-oxoglutarato oxigenases (VALEGARD *et al.*, 1998; ARAVIND; KOONIN, 2001).

As enzimas 2-oxoglutarato oxigenases estão envolvidas no reparo do DNA, metabolismo dos ácidos graxos e modificações pós-traducionais. Exemplos destas são hidroxilação em resíduos de prolina e desmetilação de resíduos de lisina em histonas (HAUSINGER, 2004; CLIFTON *et al.*, 2006).

Essas proteínas regulam a homeostase energética sendo também influenciadas por sinais vindos da nutrição. Além disso, elas podem ser encontradas em tecidos que controlam este balanço energético, como o cerebral. Altas concentrações de mRNA que as originam foram identificados em uma área do hipotálamo que controla a homeostase energética (FRAYLING *et al.*, 2007). Dentre essas áreas, destacam-se os núcleos arqueado, paraventricular, dorsomedial e ventromedial, todos importantes para o controle energético (GERKEN *et al.*, 2007).

4.4.8 GHRL (*Preproghrelin, Ghrelin/obestatin prepropeptide*)

A grelina (GHRL) e a obestatina são produtos do gene da Preprogrelina, *GHRL (Ghrelin/obestatin Prepropeptide [Homo sapiens (human)], OMIM: 605353*). Este gene está localizado no cromossomo 3, na região 3p26-p25, possui 7.198pb e contém 4 éxons (*NCBI Reference Sequence: NG_011560.1*).

O mRNA é traduzido em um precursor da grelina denominado preprogrelina que contém 117 resíduos de aminoácido (KOJIMA; KANGAWA, 2005). Uma modificação pós-traducional leva a uma clivagem da proteína pela enzima prohormônio convertase 1/3, resultando no peptídeo grelina. Porém, conforme previamente mencionado, o polipeptídeo preprogrelina dá origem a 3 peptídeos. Os aminoácidos 1 ao 23 deste precursor correspondem ao peptídeo sinal, os

aminoácidos 24 ao 51 à grelina e os aminoácidos 76 ao 98 à obestatina (KOJIMA; KANGAWA, 2005; PERRET; DE VRIESE; DELPORTE, 2014).

Polimorfismos que afetam a estrutura dos produtos do gene *GHRL* podem comprometer a ação destes peptídeos e, conseqüentemente, o controle do estímulo alimentar, obesidade e diabetes tipo 2 (PERRET; DE VRIESE; DELPORTE, 2014).

Informações complementares

O peptídeo sinal faz parte da classe das sequências sinais as quais são extensões N-terminais das cadeias polipeptídicas nascentes que controlam o direcionamento de uma proteína para a membrana do retículo endoplasmático (BLOBEL, 1980, 2000). Estruturalmente é composto de uma região N-terminal (normalmente, hidrofílica e positivamente carregada), um centro hidrofóbico e uma região C-terminal com sítios específicos para ação de peptidases (VON HEIJNE, 1985, 1986).

A grelina (GHRL), um peptídeo de 28 aminoácidos secretado principalmente por células do estômago (células X/A da mucosa oxíntica gástrica, contém glândulas produtoras de $HCl_{(aq)}$), foi identificada como sendo o primeiro ligante endógeno para o receptor estimulante da secreção do hormônio de crescimento (GH), GHS-R1a. Este peptídeo também pode ser encontrado expresso em outros locais, como no duodeno, jejuno, íleo, cólon, pâncreas, rim, hipotálamo, hipófise, placenta, ovários e testículos (KOJIMA *et al.*, 1999; GNANAPAVAN *et al.*, 2002).

A GHRL pode ser encontrada na corrente sanguínea, frequentemente, em duas formas. A não acilada (mais abundante) e a acilada (ativa). A acilação de ácido n-octanoico (*O-n-octanoylation*) pela enzima O-aciltransferase (*O-acyltransferase*, GOAT) no terceiro resíduo de serina (Ser^3) deste peptídeo é necessária para que mudanças pós-traducionais possam ocorrer na grelina e esta se ligue adequadamente em seu receptor (GUTIERREZ *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2008). A acilação específica em Ser^3 também foi reportada como sendo indispensável para a habilidade da grelina em aumentar o estímulo para a ingestão de alimentos e adiposidade tanto em camundongos quanto em humanos (CHEN *et al.*, 2009). Estes mesmos autores também apresentam vários estudos nos quais as taxas de grelina não acilada/acilada variam de 2,5:1 a 9:1 em diferentes populações. Também mostram que embora a grelina não acilada tenha sido reportada, inicialmente, como

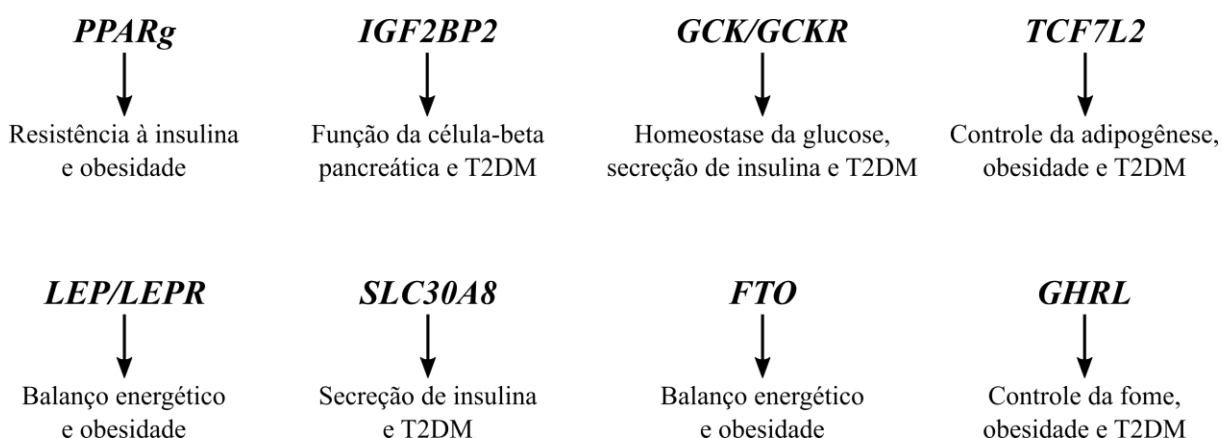
não tendo função, ela desempenha participação ativa na ingestão de alimentos, motilidade intestinal, adipogênese e secreção/resistência da insulina.

A grelina estimula o apetite (ação orexigênica), tanto em animais quanto em humanos, mediada pelo estímulo de neurônios no hipotálamo promovendo a produção e secreção de estimuladores do apetite, como por exemplo, o neuropeptídeo Y, peptídeo relacionado ao gene *agouti* (*AgRP*), além de outras orexinas (DIMARAKI; JAFFE, 2006). Concentrações séricas de grelina são encontradas aumentadas no jejum, em pacientes magros ou anoréxicos e diminuídas em obesos. Foi observada, em indivíduos após ingestão de alimentos, uma redução significativa ($P = 0,047$) das concentrações plasmáticas de grelina de 248,5 fmol/mL (+/- 15,0 fmol/mL) para 179,5 fmol/mL (+/- 17,9 fmol/mL), 120 minutos após a refeição (CUMMINGS *et al.*, 2001; TSCHOP *et al.*, 2001; SHIYA *et al.*, 2002; VAN DER LELY *et al.*, 2004).

A obestatina (23 resíduos de aminoácidos) possui ação antagônica à da grelina. Foi sugerido que quando este oligopeptídeo se liga ao receptor acoplado à proteína-G (GPR39), pode inibir a ingestão de alimentos (ZHANG *et al.*, 2005). Além disso, Chen e colaboradores (2009) reportaram que a obestatina tem também ação na melhora da memória, inibição da sede (camundongos), ativação de neurônios no córtex e influência no sono. Um resumo de cada gene está apresentado na Figura 2.

4.4.9 Resumo dos genes investigados

FIGURA 2 – GENES INVESTIGADOS, PRINCIPAIS FUNÇÕES E ASSOCIAÇÕES.



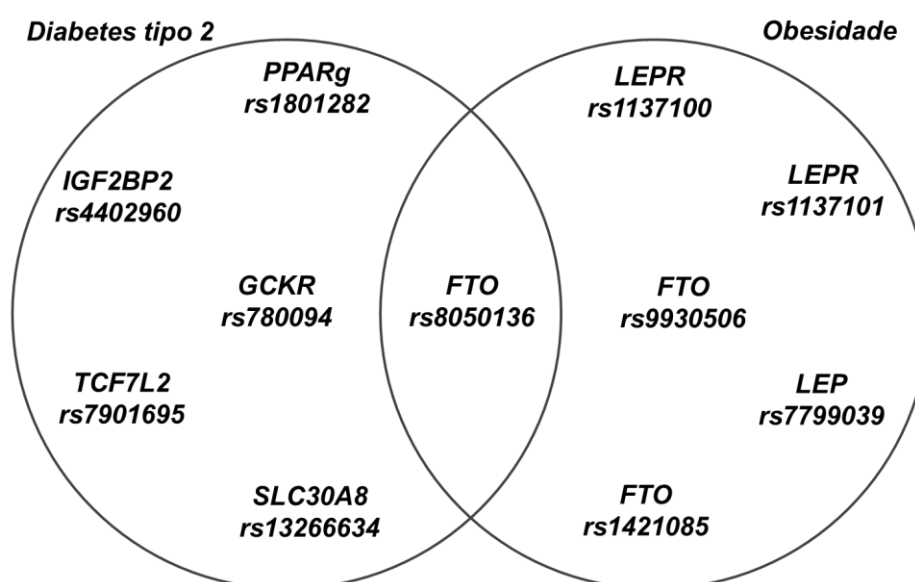
Em negrito, cada gene estudado. Genes cujos produtos ou função estão diretamente relacionados foram representados em conjunto separados por uma barra normal "/".

5 MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia para a realização desta tese consistiu em:

- Analisar 11 polimorfismos de único nucleotídeo em genes-alvo, pelo método de *TaqMan*[®], pois as frequências dos alelos menores dessas variantes, em diferentes populações, mostraram-se associadas à destas desordens metabólicas. A variabilidade genética foi genotipada pelo método de *TaqMan*[®]. Os genes selecionados foram: Receptor gamma Ativado por Proliferadores de Peroxissomo (*PPARg*), Proteína 2 Ligante de mRNA do Fator de Crescimento 2 Semelhante à Insulina (*IGF2BP2*), Proteína Reguladora da Glucoquinase (*GCKR*), Fator de Transcrição 7 semelhante ao 2 de Células-T Específicas (*TCF7L2*), Leptina (*LEP*), Receptor da Leptina (*LEPR*), Membro 8 da Família 30 dos Carreadores de Solute (*SLC30A8*) e Gene da Massa Gorda associada à obesidade (*FTO*). Todos apresentam associação, de forma isolada ou conjunta, com o *Diabetes mellitus* tipo 2 e/ou obesidade e diferentes populações reportadas na literatura. A Figura 3 mostra os genes e seus polimorfismos.

FIGURA 3 – VARIANTES GENOTIPADAS COM SONDAS TAQMAN[®]

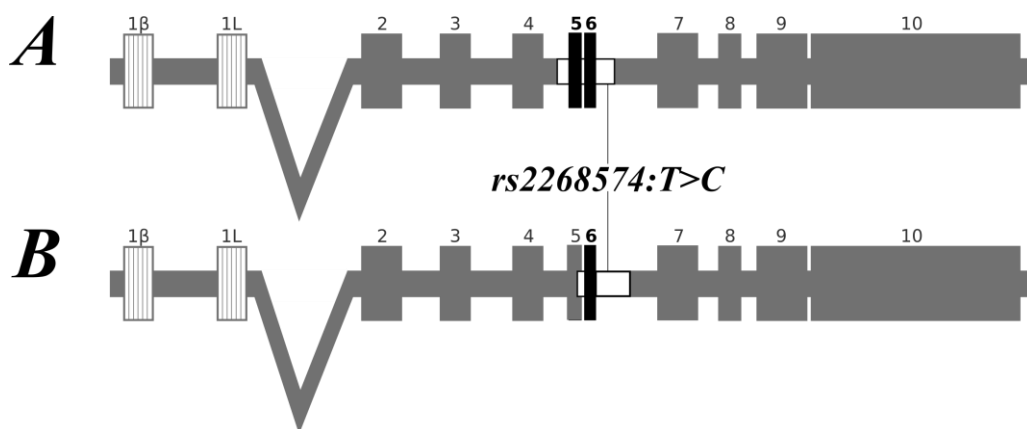


Genes e polimorfismos escolhidos para serem investigados.

- Sequenciar uma amostra da população brasileira, na tentativa de monitorar uma variação genética (*rs2268574:T>C*) no gene da enzima glucoquinase

para melhor tentar entender o efeito desta variante no *Diabetes mellitus* gestacional, no *Diabetes mellitus* tipo 2 e/ou obesidade. No mestrado a variação genética *rs2268574:T>C* (*GCK*) foi identificada por PCR-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*, Polimorfismo identificado pela análise conformacional de fita simples, descrita por Orita e colaboradores (1989)) e confirmada por sequenciamento de DNA ao estudarmos o diabetes gestacional. Foram sequenciadas todas as amostras que possuíam um padrão de PCR-SSCP o qual diferia do padrão usual, além de 20% das amostras com padrões usuais. Porém, como esta variante foi encontrada no final da sequência do amplicon de 505 pares de base (pb) que contém os exons 5, 6 e regiões flangeadoras descrito por Tinto e colaboradores (2008), foi decidido, agora no doutorado, aumentar o número amostral e sequenciar todas as amostras de gestantes saudáveis e diabéticas gestacionais utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (primers) propostos por Tinto e colaboradores (2008), o que chamamos, neste doutorado, de Amplicon 1 (*GCK*). Além disso, desenhamos um novo par de primers que monitorasse melhor essa variante, deixando-a na região central do amplicon, o que chamamos de Amplicon 2 (*GCK*). Este novo par de primers foi exclusivamente utilizado nos ensaios com outro grupo de amostra composto por mulheres saudáveis, diabéticas tipo 2 obesas e portadoras de obesidade sem diabetes. A Figura 4 faz um comparativo entre esses amplicons 1 e 2.

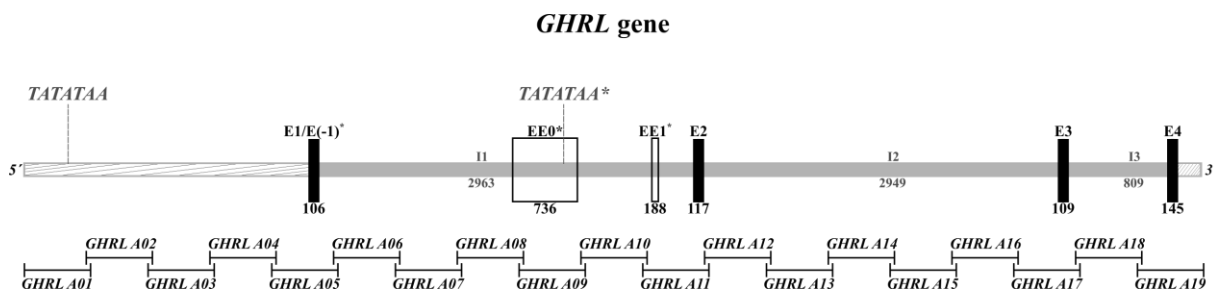
FIGURA 4 – AMPLICONS 1 E 2 DA VARIANTE *rs2268574:T>C* (*GCK*)



A barra cinza representa o gene *GCK*. Caixas 1β e 1L, promotores pancreáticos e hepáticos. As outras caixas numeradas, os éxons. O retângulo branco cobrindo os éxons 5, 6 (destacados em A) o amplicon 1 gerado pelos primers de Tinto e colaboradores (2008). O retângulo branco cobrindo o final do exon 5, todo o exon 6 (destacado em "B") o amplicon 2 gerado pelo novo par de primer desenhado.

- Foram desenhados *in silico* 19 pares de primers para sequenciar o gene *GHRL* em uma subamostra de mulheres saudáveis, diabéticas tipo 2 obesas e obesas sem diabetes (Figura 5).

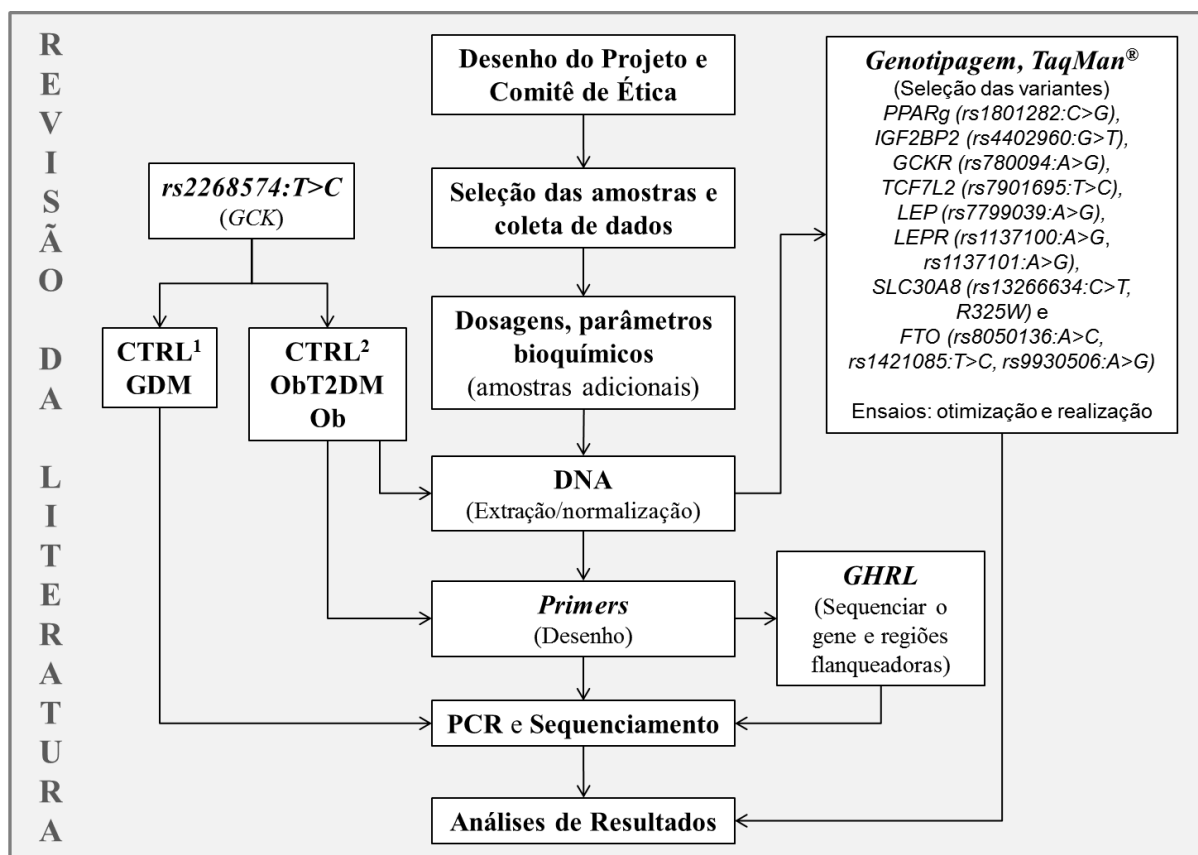
FIGURA 5 – ESTRUTURA DO GENE *GHRL*, PRIMERS E AMPLICONS



5', região promotora. 3', UTR. Em cinza, íntrons. As caixas representam os éxons (em preto, NCBI; translúcidas com asterisco, Seim e colaboradores (2007)). *GHRL A01-19* (barras horizontais), amplicons gerados pelos 19 pares de primer (extremidade vertical da barra horizontal). A região de sobreposição dos amplicons foi de 200-300pb. TATATAA, sequência promotora (encontrada pelo autor). TATATAA*, descrita por Seim e colaboradores (2007). Figura construída com base nas informações retiradas de (NCBI Reference Sequence: NG_011560.1) e Seim e colaboradores (2007).

A estratégia utilizada para realização da tese está sumarizada na Figura 6.

FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE EXECUÇÃO DA PESQUISA.



rs2268574:T>C (GCK) → CTRL¹ e GDM, amplicon gerado com os primers propostos por Tinto e colaboradores (2008), nesta tese chamado de Amplicon 1 (GCK). CTRL¹, gestantes saudáveis, GDM, portadoras de diabetes gestacional.

rs2268574:T>C (GCK) → CTRL², ObT2DM e Ob, amplicon gerado com o novo par de primers desenhado, nesta tese chamado de Amplicon 2 (GCK). CTRL², mulheres saudáveis, ObT2DM, mulheres portadoras de diabetes tipo 2 obesas e Ob, mulheres obesas sem diabetes.

5.1 AMOSTRAS

As amostras deste estudo foram utilizadas do biorrepositório do laboratório de Bioquímica Clínica I e II da Universidade Federal do Paraná. Amostras adicionais foram coletadas no Hospital da Polícia Militar do Estado do Paraná e no Centro de Análises Clínicas Dra. Maria Silvia (Ribeirão Claro, Paraná), após autorização de coleta pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná mediante emenda. Este projeto teve aprovação do CEP sob o registro CAAE: 01038012.2.0000.0102.

Quando as amostras de sangue e soro dos pacientes foram obtidas tanto para compor o biorrepositório quanto as adicionais, foram coletadas durante a realização dos exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento,

não tendo sido necessário a realização de coleta específica para o projeto em tela, já que os tubos para as amostras foram obtidos após a realização dos exames de rotina dos sujeitos da pesquisa que concordaram em participar do estudo. Os dados antropométricos, clínicos e laboratoriais das pacientes estavam contidos nos prontuários, dispensando a necessidade de entrevista.

Para o estudo da variação genética *rs2268574:T>C* do gene da *GCK* foram utilizadas amostras de portadoras de diabetes gestacional (GDM) e gestantes saudáveis (CTRL). Para caracterização das pacientes com GDM foram utilizados os critérios da Associação Americana de Diabetes (2010). Este polimorfismo também foi analisado em outros 3 grupos apresentados na Tabela 2. Porém em cada situação um par diferente de primers foi utilizado.

Para a investigação de associação dos polimorfismos com o diabetes tipo 2 e obesidade (não foram considerados indivíduos com sobrepeso) tanto pelo método *TaqMan*[®] quanto pelo sequenciamento de DNA (gene *GHRL*), as amostras foram selecionadas e classificadas nos grupos apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS.

CARACTERÍSTICAS	GRUPOS EM ESTUDO		
	CTRL	ObT2DM	Ob
n	141	130	42
Idade	≥40	≥40	≥40
HbA1C (%)	4,5-5,7	≥6,5	<6,5
Glicemia jejum (mg/dL)	60-99	>99	<126
IMC (kg/m ²)	15,0-24,9	≥30	≥30

CTRL, grupo controle; ObT2DM, diabéticas tipos 2 obesas; Ob, obesas sem diabetes tipo 2.

n, número de indivíduos de cada grupo estudado; HbA1C (%), Hemoglobina glicada (%); IMC, Índice de Massa Corpórea (kg/m²). Estão sendo considerados os critérios da Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association*, ADA, (2010) e (2011)) para diagnóstico e caracterização do diabetes e obesidade.

5.2 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA genômico das amostras avaliadas neste estudo foi extraído do *pool* de leucócitos do sangue pelo método *salting out*, proposto por Miller e colaboradores (1988), otimizado.

A quantificação do DNA extraído (soluções concentradas) foi realizada por espectrofotometria em 260nm (DNA) e 280nm (proteína) (sistema *Nanodrop*). As amostras com concentração inferior a 20ng/μL e razão A_{260}/A_{280} (pureza)

menor que 1,7 ou maior que 2,1 (o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra) não foram utilizadas nos ensaios.

As soluções concentradas de DNA as quais estavam dentro dos critérios para uso foram normalizadas a 20ng/μL para serem utilizadas nos ensaios de PCR em tempo real utilizando sondas fluorescentes do tipo *TaqMan*[®]. Esta concentração também serviu para a realização dos outros ensaios realizados.

5.3 MÉTODOS UTILIZADOS

5.3.1 Reação em cadeia da Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em termociclador MG96 (*Biocycler*). A PCR foi utilizada para amplificar tanto os 19 amplicons do gene *GHRL* quanto os amplicons 1 e 2 que continham o polimorfismo *rs2268574:T>C* localizado no íntron 6 do gene *GCK* e avaliaram o GDM e ObT2DM/Ob, respectivamente, comparados com indivíduos saudáveis.

Os primers desenhados e utilizados nos ensaios, assim como as características de cada um, estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 3 – PRIMERS (01-10) PARA O GENE *GHRL*.

Região/Amplicon/Primers	TA (5'→3')	T _m (°C)	G/C (%)
Gene <i>GHRL</i>			
5' UTR			
Amplicon GHRL01	337		
PFGHRL01HRF (20 pb)	agctaataagccgacggtga	59,9	50,0
PRGHRL01HRF (20 pb)	atggaccgctaagagccata	59,7	50,0
Amplicon GHRL02	594		
PFGHRL02HRF (21 pb)	tgaagctttcctcatgaatcc	59,3	42,9
PRGHRL02HRF (23 pb)	tccagtgtgtgttcttacagtgc	60,3	47,8
Amplicon GHRL03	575		
PFGHRL03HRF (20 pb)	gggatgagagagcatggcta	60,3	55,0
PRGHRL03HRF (20 pb)	ggcataccttgaggcatta	59,9	50,0
Amplicon GHRL04	598		
PFGHRL04HRF (24 pb)	catatgctgttcacacttagact	58,5	41,7
PRGHRL04HRF (22 pb)	ccttcctcattctttcaagtgt	58,0	40,9
Éxon 1 e íntron 1 (Início)			
Amplicon GHRL05	593		
PFGHRL05HRF (20 pb)	ccaccaagttccaaaaagga	59,9	45,0
PRGHRL05HRF (20 pb)	agcccagagaggctgaatgt	61,3	55,0
Íntron 1			
Amplicon GHRL06	565		
PFGHRL06HRF (20 pb)	gttggtggctctgaaaaagc	59,9	50,0
PRGHRL06HRF (20 pb)	cctcactttccccaagcta	59,3	50,0
Amplicon GHRL07	625		
PFGHRL07HRF (20 pb)	atggagccagatggcatatc	59,9	50,0
PRGHRL07HRF (20 pb)	ccccaggaatttcttccttt	59,4	45,0
Amplicon GHRL08	654		
PFGHRL08HRF (20 pb)	gagctcctctcctgaactgc	59,3	60,0
PRGHRL08HRF (20 pb)	ttgttcccatgtgctgttg	60,6	45,0
Amplicon GHRL09	625		
PFGHRL09HRF (20 pb)	cggaaggtgtagaatcacc	59,4	55,0
PRGHRL09HRF (20 pb)	gacatcccccggttttagag	59,4	55,0
Íntron 1 (Fim)			
Amplicon GHRL10	585		
PFGHRL10HRF (20 pb)	ctactctccgtgtgcgtttg	59,5	55,0
PRGHRL10HRF (19 pb)	ccaagtcagccagagcat	61,4	57,9

Região/Amplicon/Primers, região investigada (de acordo com *NCBI Reference Sequence: NG_011560.1*), nome dos amplicons e nome dos primers desenhados com seus respectivos tamanhos em pares de bases (pb). TA (5'→3'), Tamanho do amplicon e sentido dos primers (5'→3'). T_m (°C), temperatura de *melting*, anelamento, hibridização. G/C (%), porcentagem de desoxiguanilato e desoxicitidilato.

GHRL, gene da preprogrelina.

5' UTR, 5' *Untranslated Region*, região 5' não traduzida.

As linhas em cinza separam cada região do gene estudada com seus respectivos amplicons.

PF, Primer *Forward*, direto. PR, Primer *Reverse*, reverso ou indireto.

TABELA 4 – PRIMERS (11-19) PARA O GENE *GHRL* E PARA O GENE *GCK*.

Região/Amplicon/Primers	TA (5'→3')	T _m (°C)	G/C (%)
Éxon 2 e Íntron 2 (Início)			
Amplicon GHRL11	598		
PFGHRL11HRF (20 pb)	gagcaagctcagaggcacat	60,7	55,0
PRGHRL11HRF (20 pb)	5ctgttactgccacctctcc	60,9	60,0
Íntron 2			
Amplicon GHRL12	596		
PFGHRL12HRF (20 pb)	ggtcggtagctctgcagttt	59,2	55,0
PRGHRL12HRF (20 pb)	ccccgtaaaatcctttactcc	59,2	55,0
Amplicon GHRL13	600		
PFGHRL13HRF (21 pb)	gatgtgctctgacaaatcgtg	59,3	47,6
PRGHRL13HRF (20 pb)	gtgaggatgaaagcgagcag	61,1	55,0
Amplicon GHRL14	600		
PFGHRL14HRF (20 pb)	tccagaggagtgaatgtgc	61,1	55,0
PRGHRL14HRF (18 pb)	aatgggagtgaggacttg	58,3	55,6
Amplicon GHRL15	581		
PFGHRL15HRF (20 pb)	tctcatctcaggcccctcta	59,9	55,0
PRGHRL15HRF (19 pb)	ccacttggccctgaaaact	60,1	52,6
Amplicon GHRL16	581		
PFGHRL16HRF (19 pb)	acagggaggcactgaggac	60,3	63,2
PRGHRL16HRF (20 pb)	agtcaccaatggcagcattt	60,5	45,0
Íntron 2 (Fim) e Éxon 3			
Amplicon GHRL17	600		
PFGHRL17HRF (20 pb)	aaggaatagaaggccagcag	58,6	50,0
PRGHRL17HRF (21 pb)	ggaaaactcatcccccacaga	60,0	47,6
Íntron 3 (Início)			
Amplicon GHRL18	589		
PFGHRL18HRF (18 pb)	ctgcctggactgggttg	60,2	61,1
PRGHRL18HRF (20 pb)	gtgaatgtacccctgtgt	60,1	55,0
Íntron 3 (Fim), Éxon 4 e 3' UTR			
Amplicon GHRL19	593		
PFGHRL19HRF (20 pb)	attgaggtggcagaaacacc	60,0	50,0
PRGHRL19HRF (20 pb)	ttggccttgctactgtcct	59,9	50,0
Gene GCK			
Éxons 5 e 6 e flaqueadoras			
Amplicon 1 (GCK)	505		
PFGCKE5e6 (20 pb)	tctgagcctgttctcagc	60,7	55,0
PRGCKE5e6 (20 pb)	ggccctgaagcctgttgta	62,4	55,0
Éxon 6 (Fim) e Íntron 6 (Parte)			
Amplicon 2 (GCK)	387		
PFrs2268574HRF (21 pb)	ctatcaaacggagaggggtga	61,4	52,4
PRrs2268574HRF (22 pb)	catcttgataccccaagaccac	60,6	50,0

Região/Amplicon/Primers, região investigada (de acordo com *NCBI Reference Sequence: NG_011560.1*), nome dos amplicons e nome dos primers desenhados com seus respectivos tamanhos em pares de bases (pb). TA (5'→3'), Tamanho do amplicon e sentido dos primers (5'→3'). T_m (°C), temperatura de *melting*, anelamento, hibridização. G/C (%), porcentagem de desoxiguanilato e desoxicitidilato.

GCK, gene da glucoquinase. Amplicon 1 (GCK), gerado com primers propostos por Tinto e colaboradores (2008); Amplicon 2 (GCK), gerado com primers desenhados para este estudo.

As linhas em cinza separam cada região do gene estudada com seus respectivos amplicons. 3' UTR, 3' *Untranslated Region*, região 3' não traduzida. PF, Primer *Forward*, direto. PR, Primer *Reverse*, reverso ou indireto.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados e analisados, *in silico*, utilizando o programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Antes de serem comprados, todos os primers foram alinhados com o genoma humano pelo programa *BlastN* suíte (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Os primers (sintetizados pela *Invitrogen*™) foram solubilizados e diluídos para 10 pmol/μL para a realização dos ensaios de PCR.

A PCR foi realizada em volume final de 25μL. A reação foi otimizada para temperatura de hibridização (anelamento, *melting*, T_m), concentrações de Mg^{2+} e tempos de ciclagem de acordo com a necessidade de cada experimento. As reações foram realizadas segundo o protocolo apresentado na Tabela 5.

TABELA 5 – CONDIÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE PCR.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME (μL)
Água reagente estéril	-----	17,3
Tampão Taq 10X	1X	2,5
Primer Forward (10 pmol/μL)	0,2 pmol/μL	0,5
Primer Reverse (10 pmol/μL)	0,2 pmol/μL	0,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 mM	1,0
dNTP (5 mM)	0,2 mM	1,0
r-Taq DNA polimerase (5 U/μL)*	0,04 U/μL	0,2
DNA molde (20 ng/μL)	30 ng/25μL	2,0
TERMOCICLADOR - ETAPAS DA PCR	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (s)
1 - Desnaturação inicial	95	120
2 - Desnaturação	94	40
3 - Hibridização dos primers	T_m	40
4 - Extensão	72	120
5 - Repetir 33 vezes as etapas 2, 3 e 4		
6 - Extensão final	72	600
7 - Hold (resfriamento, espera)	4	Fim da Reação
AMPLICONS	T_m (°C)	
GHRL01-10, GHRL12 e GHRL15	62,0	
GHRL11 e GHRL14	62,5	
GHRL13	63,0	
GHRL16-19	64,5	
Amplicon 2 do gene <i>GCK</i>	62,0	
Amplicon 1 do gene <i>GCK</i>	65,0	

GHRL01-19, amplicons do gene da grelina.

**Recombinant Taq DNA Polymerase* (5000 U/ml, 250U), código: 270798, *GE Healthcare*.

Amplicons 1 do gene *GCK*, Primers descrito por Tinto e colaboradores (2008). Amplicon 2 do mesmo gene, novos primers desenhados para melhor monitorar a variação genética *rs2268574:T>C*.

As eletroforeses dos produtos de PCR foram realizadas em géis de agarose 2,0% com tampão TBE 1X (89 mM TRIS, ácido bórico 89 mM, EDTA 2mM, pH 8,3). As condições de voltagem, amperagem e tempo de eletroforese foram respectivamente, 80V, 40mA e 80 min.

Os géis de tamanho de 10 cm/6cm (cuba *Mini-Sub[®] Cell GT, Bio-RAD*) foram utilizados com pentes de 8 poços. Nestes foram aplicados marcador de massa molecular (100pb *DNA Ladder, Invitrogen, Life Technologies[®]*), controles negativos da reação (B1 e B2, brancos 1 e 2 respectivamente) e amostras do específico amplicon estudado e mostrado no gel (A1-A5).

Em cada gel foram aplicados 5 µL da mistura (3 µL de cada amplicon + 2 µL de *Loading Dye* (Azul de bromofenol 0,03 %; xileno cianol 0,03 %; 60 mM EDTA, pH 7,6 e glicerol 60%). Ao final da eletroforese, cada amplicon foi revelado com solução de brometo de etídeo (1 µg/mL, 7 min) e fotodocumentado em sistema UV (*L-Pix EX Transiluminator, Loccus Biotecnologia*). Após obtenção dos produtos de PCR, foi realizado o sequenciamento de DNA pelo método de *Sanger*.

5.3.2 Sequenciamento de DNA

Os ensaios de digestão, reação de sequenciamento de DNA e purificação dos produtos sequenciados foram realizados em termociclador MG96 (*Biocycler*) do laboratório de Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Inicialmente, os produtos de PCR foram tratados com as enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão (EXO 20U/µL, SAP 1U/µL) para a remoção dos primers e dNTPs, processo conhecido como digestão. A digestão foi realizada com o *pool* (mistura) de enzimas Exo-SAP em tubo de polipropileno de 200 µL. As etapas programadas em termociclador foram: 37 °C (30 min), 80 °C (15 min) e *hold* (espera/resfriando) 4 °C, caracterizando o final da reação. Todo o volume desta reação foi utilizado na reação de sequenciamento.

O produto da etapa previamente descrita foi misturado com um MIX contendo os reagentes necessários para a reação de sequenciamento (tampão *Save Money, Big Dye Terminator (Applied Biosystems)* e o primer *forward*). A reação de sequenciamento foi realizada em tubo de polipropileno de 200 µL. As etapas programadas em termociclador foram: Desnaturação inicial (96 °C, 15 s); 33 ciclos

compostos pelas etapas de desnaturação (94 °C, 30 s), hibridização do primer *forward* (62 °C, 40 s) e extensão final da polimerase (60 °C, 4 min). A reação de sequenciamento foi finalizada pela etapa *hold* a 4 °C.

Terminada a reação de sequenciamento, os produtos sequenciados foram purificados. A purificação foi realizada em tubo de 500 µL. As etapas programadas em centrífuga *MiniSpin*[®] (*Eppendorf*) após adição de água, acetato de amônio e etanol absoluto foram: 45min (13.400rpm). Finalizada esta etapa, todo o sobrenadante foi descartado. No mesmo tubo a adição de etanol 70% (V/V) compôs a etapa de lavagem a qual foi realizada em duplicata, cada qual com 15 min de centrifugação a 13.400 rpm tendo o sobrenadante totalmente descartado.

Por fim, a etapa de secagem foi realizada por 40 min a 65 °C em aquecedor para tubos. Após a desidratação os produtos foram e levados para o departamento de bioquímica e biologia molecular da UFPR (sob autorização do prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza) para a eletroforese dos produtos sequenciados. Esta etapa foi conduzida por Valter Baura em equipamento 3500 XL (Applied Biosystems).

O protocolo contendo todas as etapas da reação de sequenciamento consta apresentado na Tabela 6 em detalhes.

TABELA 6 – PROTOCOLO DE DIGESTÃO, SEQUENCIAMENTO E PURIFICAÇÃO.

DIGESTÃO		SEQUENCIAMENTO		PURIFICAÇÃO	
Reagentes	(µL)	Reagentes	(µL)	Reagentes	1x (µL)
EXO (20U/µL)	0,17	Água Mili-Q	4,0	Água Mili-Q	10,0
SAP (1U/µL)	0,33	Tampão <i>Save Money</i>	3,2	Ac. de Amônio (7,5M)	2,0
Água Mili-Q	0,50	<i>Big Dye Terminator</i>	2,0	Etanol (99%)	66,0
		Primer	0,8	Amplicon	22
Amplicon	22	Amplicon	22	Etanol (70%)	100,0

EXO, Exonuclease I; SAP, Fosfatase Alcalina de Camarão (*Shrimp Alkaline Phosphatase*).

Os arquivos (extensão *.ab1* e *.seq*) gerados pelo programa do equipamento 3500 XL continham as sequências e eletroferogramas das amostras sequenciadas. As sequências foram comparadas com a sequência consenso presente no banco de dados *GenBank* (*GHRL: NG_011560.1* e *GCK: NG_008847.1*). Para a análise dos eletroferogramas das sequências foi utilizado o programa *CodonCode Aligner* v5.1.5.

5.3.3 Reação de PCR em Tempo Real com Sondas *TaqMan*[®]

Foram analisados 11 polimorfismos de único nucleotídeo em 8 genes-alvo, pelo método de *TaqMan*[®]. Os 8 genes selecionados foram: Receptor gamma Ativado por Proliferadores de Peroxissomo (*PPARg*), Proteína 2 Ligante de mRNA do Fator de Crescimento 2 Semelhante à Insulina (*IGF2BP2*), Proteína Reguladora da Glucoquinase (*GCKR*), Fator de Transcrição 7 semelhante ao 2 de Células-T Específicas (*TCF7L2*), Leptina (*LEP*), Receptor da Leptina (*LEPR*), Membro 8 da Família 30 dos Carreadores de Solute (*SLC30A8*) e Gene da Massa Gorda associada à obesidade (*FTO*).

Como critério de seleção dos polimorfismos, foi considerada a frequência do alelo menor, a associação com o diabetes tipo 2 e/ou obesidade em diferentes populações, além do fato de estas variantes não terem sido estudadas em conjunto em uma amostra da população brasileira (sul do país) com as características adotadas nos grupos estudados. A Tabela 7 apresenta informações das variantes escolhidas para serem investigados pelo método de *TaqMan*[®].

TABELA 7 – POLIMORFISMOS GENOTIPADOS PELO MÉTODO *TAQMAN*[®].

GENE (OMIM)	RC	LOCAL NO GENE	VARIANTE	CÓDIGO <i>TAQMAN</i> [®]
<i>PPARg</i> (601487)	3p25	Éxon B	<i>rs1801282:C>G</i>	C__1129864_10 [SG, 20x]
<i>IGF2BP2</i> (608289)	3q27.2	Íntron 2	<i>rs4402960:G>T</i>	C__2165199_10 [SG, 40x]
<i>GCKR</i> (600842)	2p23	Íntron 16	<i>rs780094:C>T</i>	C__2862873_10 [SG, 40x]
<i>TCF7L2</i> (602228)	10q25.3	Íntron 3	<i>rs7901695:C>T</i>	C__384583_10 [SG, 40x]
<i>LEP</i> (164160)	7q31.3	Promotor	<i>rs7799039:G>A</i>	C__1328079_10 [SG, 40x]
<i>LEPR</i> (601007)	1p31	Éxon 4	<i>rs1137100:A>G</i>	C__518168_20 [SG, 40x]
		Éxon 4	<i>rs1137101:A>G</i>	C__8722581_10 [SG, 40x]
<i>SLC30A8</i> (611145)	8q24.11	Éxon 11	<i>rs13266634:C>T</i>	C__357888_10 [SG, 40x]
		Íntron 1	<i>rs1421085:T>C</i>	C__8917103_10 [SG, 40x]
<i>FTO</i> (610966)	16q12.2	Íntron 1	<i>rs8050136:C>A</i>	C__2031259_10 [SG, 40x]
		Íntron 1	<i>rs9930506:A>G</i>	C__29819994_10 [SG, 40x]

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man[®] (<http://omim.org/>). RC, região cromossômica.

rs, dbars: reference SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

Código *TaqMan*[®], específico para cada polimorfismo (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

Os ensaios de PCR em tempo real utilizando sondas fluorescentes do tipo *TaqMan*[®] foram realizados em equipamento de PCR em tempo real 7500 FAST (*Applied Biosystems/Life Technologies*) no laboratório de Bioquímica Clínica I e II da Universidade Federal do Paraná, sob autorização do Prof. Dr. Geraldo Picheth.

Para cada amostra foi realizado o ensaio *TaqMan*[®] conforme o protocolo apresentado na Tabela 8. Na reação estavam presentes os reagentes *TaqMan Master Mix*, *SNP Genotyping Assay* (sonda de hidrólise), água ultrapura (Mili-Q) compondo o Super Master Mix. Esta mistura foi distribuída na placa de 96 poços e, posteriormente, cada amostra de DNA (20,0ng/μL) foi adicionada ao Super Master Mix (Composto pelo *Master Mix*, *SNP Genotyping Assay* e água Milli-Q.). Todos os ensaios foram realizados em placa de 96 poços com dois controles negativos (apenas Super Master Mix) por placa para monitoramento de contaminações. Além disso, três amostras que foram uma primeira vez discriminadas como sendo cada um dos possíveis perfis (homozigoto usual, heterozigoto e homozigoto menos frequente (menor)) foram consideradas controles positivos e repetidas em todos os ensaios do respectivo polimorfismo para maior confiabilidade. Em todos os ensaios os padrões já obtidos se repetiram e com isso, pôde ser observado consistência nos resultados de discriminação alélica. A Tabela 8 mostra os reagentes utilizados, assim como seus respectivos volumes na reação.

TABELA 8 – PROTOCOLO DEFINIDO PARA TÉCNICA DE *TaqMan*[®] EM PCR EM TEMPO REAL

REAGENTES	VOLUME (μL)*
Master Mix	3,0
<i>SNP Genotyping Assay</i> (sonda <i>TaqMan</i> [®])	0,1
Água Milli-Q (ultra pura)	1,9
DNA (20ng/μL)	3,0
Total	8,0

*Quantidade de reagentes para cada amostra.

As condições de reação utilizadas para todos os polimorfismos foram: 10min a 95 °C no primeiro estágio de espera (*holding stage*, 10 min). Após este tempo, 40 ciclos foram realizados (*cycling stage*) compostos por 2 etapas: desnaturação a 95°C (15 s) e hibridização das sondas e extensão da polimerase a 60 °C (2 min). Finalizados os ciclos, a etapa final (*holding stage*) foi realizada em 1 min a 60 °C. O sistema e *software 7500 FAST* realizou e determinou as leituras finais das fluorescências das reações (ver apêndice). Além disso, este programa do equipamento reportou a qualidade dos resultados de genotipagem como sendo iguais ou superiores a 98%.

Após a realização dos ensaios moleculares, biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal foram quantificados para comparação.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES

As amostras selecionadas do biorrepositório já possuíam seus biomarcadores quantificados. Amostras adicionais foram quantificadas em sistema automatizado *Cobas Mira (Roche)* do laboratório de Bioquímica Clínica I e II da Universidade Federal do Paraná. A Tabela 9 apresenta os ensaios realizados, bem como os princípios metodológicos empregados.

TABELA 9 – BIOMARCADORES AVALIADOS NESTE ESTUDO.

ANALITOS	ABR	PRINCÍPIOS	REAGENTES	CVa (%)	IR
Ácido úrico	AU	Uricase, 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzoico	Abbot Laboratórios do Brasil Ltda.	1,6	2,6-6,0 mg/dL
Albumina	ALB	Reação com verde de bromocresol.	Abbot Laboratórios do Brasil Ltda.	1,3	3,5-5,0 g/dL
Colesterol total	COL	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase	Abbot Laboratórios do Brasil Ltda.	1,3	<200 mg/dL
Creatinina	CRE	Picrato alcalino cinético.	Abbot Laboratórios do Brasil Ltda.	3,2	0,6-1,1 mg/dL
Glucose	GLU	Hexoquinase	Abbot Laboratórios do Brasil Ltda.	1,71	<100 mg/dL
Hemoglobina glicada	HbA1C	Imunoturbidimétrico	Roche Diagnostica Brasil	0,74	<6,5%
HDL-colesterol*	HDL-c	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico.	Abbot Laboratórios do Brasil Ltda.	5,1	Desejável: >40 mg/dL Baixo: <40 mg/dL
LDL-colesterol*	LDL-c	Cálculo pela equação de Friedewald**	---	---	<130 mg/dL
Proteínas Totais	PT	Reação do Biureto.	Abbot Laboratórios do Brasil Ltda.	1,4	6,0–8,0 g/dL
Triglicérides*	TRI, TG	Ensaio enzimático com lipase, glicerol quinase, glicerol-3-fostato oxidase e peroxidase - Reação de Trinder.	Abbot Laboratórios do Brasil Ltda.	1,6	<150 mg/dL
Ureia	URE	Ensaio cinético com uréase GLDH e NADH	Abbot Laboratórios do Brasil Ltda.	1,1	15-44 mg/dL

ABR, abreviaturas. IR, intervalo de referência. CVa, coeficiente de variação analítica entre ensaios.

**LDL-colesterol = Colesterol total – HDL-colesterol – (Triglicérides/5).

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E DE *SPLICING*

A normalidade foi avaliada com o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal foram comparadas pelo teste “*t*” de

Student (Chi-quadrado) ou análise de variância (ANOVA) conforme apropriado. Variáveis contínuas sem distribuição normal foram comparadas com o teste “*U*” de *Mann-Whitney*, ou teste de *Kruskal-Wallis*, conforme apropriado.

Variáveis categóricas (Ex.: genes, variantes) foram comparadas com o teste do chi-quadrado, teste exato de *Fisher* bidirecional (*two-tailed*), ou Chi-quadrado com correção de *Yates*, conforme apropriado. O pacote estatístico *Statistica* para *Windows* versão 8.0 (*StatSoft, Tulsa, CA*) foi utilizado nas análises.

As frequências genotípicas, alélicas e o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HW) foram analisados usando os sítios: (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> ; <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> ; http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact_NROW_NCOLUMN_form.html e http://www.physics.csbsju.edu/stats/contingency_NROW_NCOLUMN_form.html).

Quando, em outras populações, as frequências genotípicas e alélicas não foram encontradas em artigos, foram utilizadas aquelas depositadas no banco de variantes genéticas, HapMap (INTERNATIONAL-HAPMAP-PROJECT, 2015).

A análise de sequência de amplicon para a identificação de polimorfismos foi realizada com uso do programa *CodonCode Aligner* v5.1.5 (<http://www.codoncode.com/>).

Foi utilizado para a análise de sequência de amplicon para a identificação de sítios de *splicing* o programa *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF/>), (DESMET *et al.*, 2009).

Uma probabilidade (*P*) inferior a 0,05 (5%) foi considerada significativa em todas as análises.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta tese explorou 4 abordagens interdependentes na tentativa de encontrar uma associação dos polimorfismos estudados com o diabetes gestacional, diabetes tipo 2 e obesidade. Dessa forma, 4 subitens foram elaborados para melhor distribuição e entendimento dessas buscas por associação.

6.1 ANÁLISE DA VARIANTE *rs2268574:T>C* (*GCK*, AMPLICON 1) – GDM

A Tabela 10 apresenta as características clínicas e antropométricas, frequência genotípica e alélica da variante *rs2268574:T>C* do gene da enzima glucoquinase em gestantes saudáveis (CTRL) e portadoras de *Diabetes mellitus* gestacional (GDM).

TABELA 10 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ANTROPOMÉTRICAS, FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DO SNP *rs2268574:T>C* DO GENE *GCK* NA AUSÊNCIA (CTRL) OU PRESENÇA DO *DIABETES MELLITUS* GESTACIONAL (GDM).

Parâmetros	CTRL (n=115)	GDM (n=112)	P
ID (anos)	25,8 ± 7,1	31,7 ± 6,9	0,277
IMC, kg/m ²	25,8 ± 5,2	33,3 ± 7,3	<0,001
GLU (mg/dL)	83 (79-88)	95 (67-103)	<0,001*
2h-75g Glucose, mg/dL	-	173 (157-205)	-
HbA1C (%)	-	6,1 ± 0,6	-
CRE (mg/dL)	0,8 (0,7-0,9)	0,6 (0,6-0,7)	<0,001*
AU (mg/dL)	3,6 (3,2-4,0)	4,3 (3,8-5,0)	<0,001*
COL (mg/dL)	201 ± 43	224 ± 46	0,343
HDL-c (mg/dL)	54 ± 15	54 ± 12	0,207
LDL-c (mg/dL)	124 ± 35	124 ± 39	0,488
TRI (mg/dL)	106 (80-150)	212 (177-274)	<0,001*
ALB (g/dL)	4,2 ± 0,5	3,4 ± 0,4	0,001
<i>rs2268574:T>C</i>			0,054**
C/C	34 (29,6%)	41 (36,6%)	
C/T	51 (44,3%)	56 (50,0%)	
T/T	30 (26,1%)	15 (13,4%)	
FAM (T) [95% IC]	48,3% [42-55%]	38,4% [32-45%]	0,034**

ID, idade; IMC, índice de massa corpórea; GLU, glicemia de jejum; 2h-75g glucose (teste oral de tolerância à glucose, 2h com 75g de glucose); HbA1C, hemoglobina glicada; CRE, creatinina; AU, ácido úrico; COL, colesterol total; HDL-c, HDL-colesterol; LDL-c, LDL-colesterol; TRI, triglicérides e ALB, albumina.

Os valores estão apresentados em média ± desvio padrão (distribuição normal) ou mediana (intervalo interquartil) para distribuição não normal, ou n (%).

Parâmetros laboratoriais foram medidos entre a 24-28 semanas de gestação.

A variante *rs2268574*; (c.44702 T>C) esteve no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P>0,05$). A comparação no modelo dominante não foi significativa ($P=0,239$) e significativa no modelo recessivo ($P=0,017$) FAM, frequência do alelo menor. Valores de *P*; teste-t de *Student* ou *teste-U de *Mann-Whitney* ou **teste do Chi-quadrado. Esta tabela consta publicada no artigo Frigeri e colaboradores (2014).

6.1.1 Parâmetros Antropométricos e Laboratoriais avaliando GDM

Marcadores antropométricos I – GDM

Conforme apresentado na Tabela 10, as gestantes saudáveis e diabéticas gestacionais não apresentaram diferença significativa na média do parâmetro idade. Embora seja conhecido o efeito positivo do aumento da idade com o diagnóstico de GDM (COUSTAN *et al.*, 1989) e nas classificações de risco para GDM, pacientes com menos que 25 anos tendem a apresentar risco reduzido (baixo risco) para esta patologia (METZGER *et al.*, 2007; ADA, 2010) este efeito positivo não foi observado na amostra da população estudada. Isso pode ser devido às características dos

locais de atendimento de onde as amostras foram coletadas. O Programa Mãe Curitibana atende as gestantes e as encaminha para serem atendidas no Laboratório da Prefeitura Municipal de Curitiba (LMC) entre a 24ª e 28ª semanas de gestação, período no qual a concentração dos hormônios “diabetogênicos”, fisiológicos na gravidez, é maior. Somente após a triagem pelo LMC, é que as gestantes caracterizadas como diabéticas são encaminhadas ao Serviço de Atendimento de Diabéticas Gestantes do HC-UFPR.

Valores de IMC superiores ao estabelecido como normal ($IMC < 25 \text{ kg/m}^2$), são considerados fatores de risco para o desenvolvimento do T2DM e GDM e têm aumentado significativamente nos últimos anos em diferentes populações (XIONG *et al.*, 2001; LANGER *et al.*, 2005; ADA, 2010). Na amostra da população estudada, o grupo GDM apresentou valores de IMC significativamente maior quando comparado ao grupo de gestantes saudáveis (Tabela 10). Isso era esperado, uma vez que o sobrepeso e a obesidade são considerados fatores de risco para o desenvolvimento desta patologia (ROSENBERG *et al.*, 2005).

Marcadores laboratoriais I – GDM

As determinações da glicemia, 2h-75g glucose e hemoglobina glicada confirmam a presença do diabetes gestacional e sugerem que as gestantes diabéticas apresentam controle glicêmico adequado (HbA1c média 6,1%) conforme descrito na Tabela 10.

O *Diabetes mellitus* afeta o metabolismo dos lipídeos sendo considerado fator de risco para DAC (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2015b). Além disso, assim como o DM, o GDM também apresenta efeito similar no metabolismo dessas moléculas (KNOPP *et al.*, 1980). Marcinkevage e Narayan (2010) reportaram estudos nos quais as concentrações de colesterol total, triglicérides e LDL-colesterol foram significativamente superiores em portadoras de GDM quando comparadas com gestantes saudáveis. Reportaram também que concentrações significativamente menores de HDL-colesterol foram observadas no grupo GDM.

Os grupos em estudo não apresentaram diferença significativa para o perfil lipídico, exceto para os triglicérides (TRI, TG) que apresentaram concentrações cerca de duas vezes maiores no grupo GDM ($P < 0,001$). A elevação dos TG está

associada com a resistência à insulina o que justifica os resultados observados (SOCIEDADE-BRASILEIRA-DE-DIABETES, 2015).

Creatinina, Ácido Úrico e Albumina

A concentração sérica de creatinina no intervalo de referência em ambos os grupos sugere que as gestantes em estudo não apresentam lesão renal manifesta. A concentração menor de creatinina das gestantes diabéticas (Tabela 10) pode ser explicada pelo maior fluxo urinário decorrente da hiperglicemia o que aumenta o *clearance* (depuração) da creatinina (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2012; PALMA-REIS *et al.*, 2013).

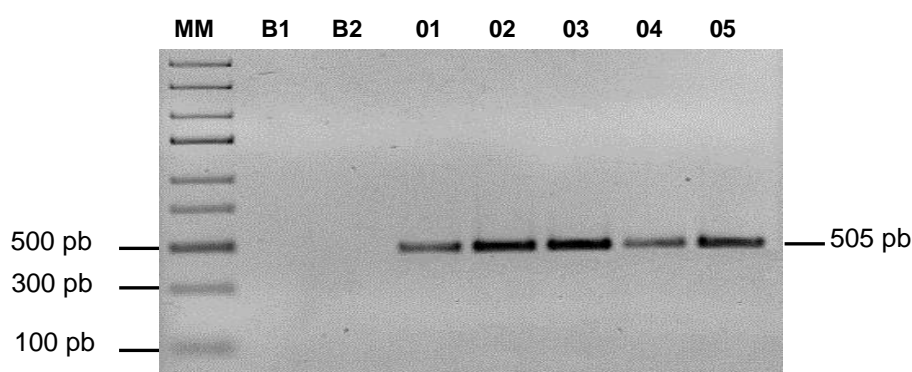
Concentrações aumentadas de ácido úrico sérico têm sido associadas com o diabetes, principalmente no estágio inicial de comprometimento do metabolismo da glucose. Nestes portadores a hiperuricemia tem sido associada tanto com complicações micro quanto macrovasculares (KATSIKI *et al.*, 2013). A Tabela 10 mostra o grupo GDM apresentando valores deste biomarcador significativamente maior quando comparado ao grupo CTRL. As concentrações em ambos os grupos em estudo estão no intervalo de referência indicando que os indivíduos tanto do grupo de saudáveis quanto de diabéticas gestacionais não possuíam, aparentemente, as lesões descritas. Resultados similares aos encontrados neste estudo foram também observados por Gungor e colaboradores (2006) estudando o diabetes gestacional. Estes autores observaram que embora a concentração deste biomarcador tenha sido maior no grupo de diabéticos, também não mostrou estar significativamente diferente entre os grupos de saudáveis e de portadoras de GDM.

A concentração de albumina do grupo GDM foi significativamente menor ($P < 0,001$) comparada à encontrada em saudáveis (Tabela 10). As hipóteses plausíveis para este achado podem caracterizar um aumento de perda proteica nas gestantes diabéticas (microalbuminúria) ou mesmo uma característica deste grupo, atendido por um Hospital Público, talvez com menor acesso a fontes proteica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015). Embora marcante esta redução de cerca de 20% no grupo GDM (4,2 vs 3,4 g/dL), em ambos os grupos as concentrações estão no intervalo de referência, o que exclui *a priori* o grupo GDM como apresentando desnutrição (WALLACH, 2009).

6.1.2 Análise Molecular I – *rs2268574:T>C (GCK)* – GDM

A reação em cadeia da polimerase realizada para a obtenção do amplicon utilizando os primers de Tinto e colaboradores (2008), Tabela 4, foi realizada conforme sugerido e descrito por esses autores. A Figura 7 mostra o amplicon obtido compatível com a massa molecular esperada no desenho dos primers.

FIGURA 7 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO AMPLICON 1 DA VARIANTE *rs2268574:T>C (GCK)*

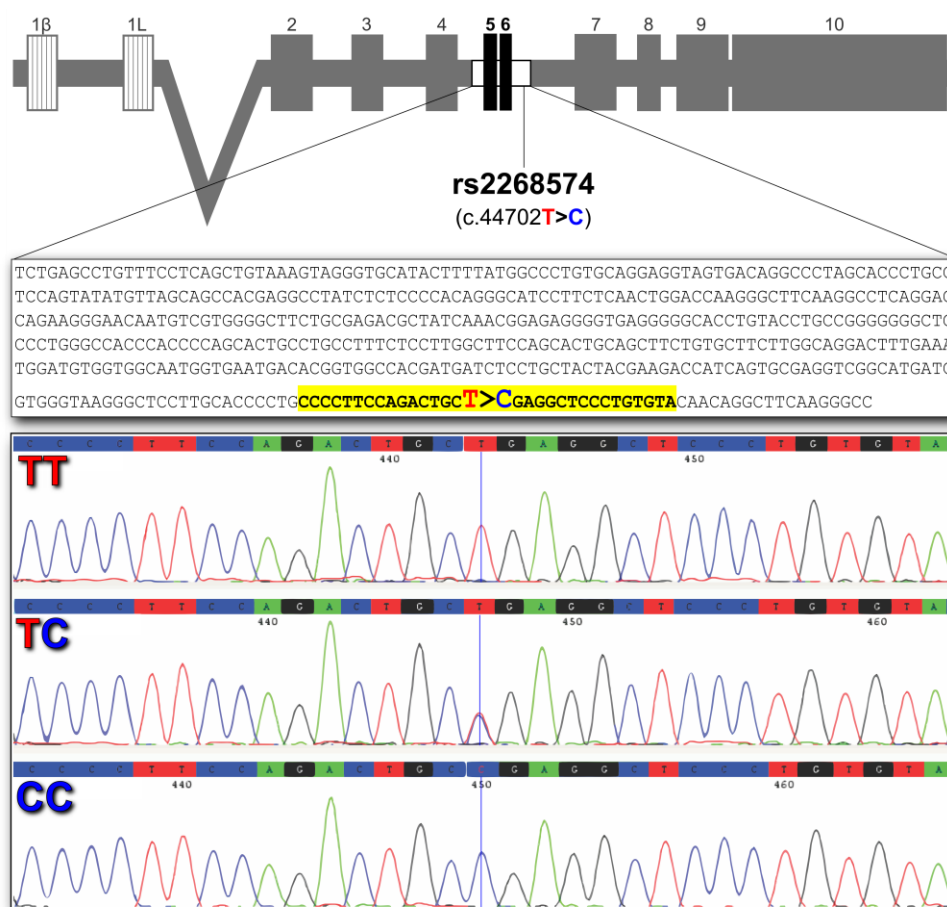


O perfil eletroforético mostra exemplo representativos do amplicon 1 para estudo do polimorfismo *rs2268574:T>C (GCK)*. Gel de agarose a 2% (m/V); Tampão TBE 1X. MM, marcador de massa molecular; B1 e B2, controles negativos da reação; A1-5, amostras distintas para o respectivo amplicon.

Todas as amostras foram sequenciadas utilizando o oligonucleotídeo iniciador direto proposto por eles. A qualidade das bases (*base-calling*) observada no eletroferograma foi igual ou superior a Q30 após serem analisadas pelo programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation).

A Figura 8 mostra a localização polimorfismo *rs2268574:T>C* no gene *GCK* de uma forma mais detalhada, assim como exemplos dos resultados de sequenciamento.

FIGURA 8 – LOCALIZAÇÃO E ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DO AMPLICON 1 DA VARIANTE *rs2268574:T>C* (GCK).



A barra cinza representa o gene GCK. Caixas 1β e 1L, promotores pancreáticos e hepáticos. As outras caixas numeradas, os éxons. O retângulo branco cobrindo os éxons 5 e 6 (destacado em preto), o amplicon 1 gerado pelos primers de Tinto e colaboradores (2008). A sequência de bases deste amplicon consta ampliada na região intermediária da figura, assim como a sequência (destaque amarelo) representada no eletroferograma mostrando os genótipos. TT, TC e CC correspondem, respectivamente, a amostras de indivíduos homozigotos usuais, heterozigotos e homozigotos menores para o polimorfismo localizado no final da sequência deste amplicon 1. A variante (em vermelho) pode ser observada na região destacada em amarelo da sequência obtida, assim como na região central dos eletroferogramas.

A variante *rs2268574:T>C* mostrou não estar associada com parâmetros antropométricos e laboratoriais. Além disso, mostrou não apresentar diferença significativa entre os genótipos dos grupos estudados, embora próximo ao valor de significância ($P=0,054$). Isso talvez possa ter sido reflexo do tamanho amostral, relativamente pequeno, embora adequado para estudos de triagem. A frequência do alelo-*T* (48%) observada nas gestantes saudáveis estudadas foi similar à encontrada

em Caucasianos (~46%) e maior do que à encontrada em Orientais (~35%) e em Africanos (~27%) (INTERNATIONAL-HAPMAP-PROJECT, 2015).

Uma diferença significativa ($P=0,034$) foi observada quando foram analisadas as frequências dos alelos menores entre os grupos CTRL e GDM estudados. Uma razão de chance (OR, *Odds Ratio* (95%IC) de 1,5 (1,03-2,17) foi identificada para o alelo-*T* dessa variante na amostra da população estudada. Sendo assim, este alelo age como um fator de proteção, fazendo com que portadoras apresentem 50% menos chance de desenvolver o diabetes gestacional.

A relevância do polimorfismo *rs2268574:T>C* e nosso interesse em explorá-lo em nossa pesquisa está em sua localização em uma possível região de *splicing* (DESMET *et al.*, 2009), determinado pelo programa *Human Splicing Finder*.

Dessa forma, a nossa hipótese é a de que esta variante possa de alguma forma alterar o metabolismo dos carboidratos. Isso porque esta variação genética, localizada no intron 6, está próxima à região exônica que codifica para os resíduos de aminoácidos localizados no sítio ativo da enzima glucoquinase. Uma alteração dessa região poderia modificar a atividade da enzima, um sensor intracelular da homeostasia da glucose, e consequentemente a secreção de insulina no pâncreas ou o metabolismo da glucose hepático (KAMATA *et al.*, 2004; MATSCHINSKY, F. M., 2009). Poucas informações estão disponíveis sobre o polimorfismo *rs2268574:T>C* de gene *GCK* e nenhum estudo na população brasileira foi identificado até o presente. Este pode ser o primeiro relato que apresenta uma associação significativa desta variação genética com o diabetes gestacional.

Com base nesses resultados, e sabendo que o GDM e o *Diabetes mellitus* tipo 2 compartilham fatores genéticos, resolvemos observar se este mesmo efeito apareceria em diabéticas tipo 2. Como também a obesidade é fator de risco para o T2DM, resolvemos testar este polimorfismo em diabéticas tipo 2 obesas e em obesas sem diabetes.

6.2 ANÁLISE DA VARIANTE *rs2268574:T>C* (GCK, AMPLICON 2) – T2DM

Nesta análise, estudamos os 3 grupos de mulheres Euro-Brasileiras da região Sul do Brasil. apresentado na Tabela 2 (item: 5 Material e Métodos, subitem: 5.1 Amostras).

6.2.1 Parâmetros Antropométricos e Laboratoriais avaliando T2DM/Obesidade

O motivo pelo qual selecionamos mulheres foi propiciar a homogeneidade gênero e porque ambas as patologias (diabetes tipo 2 e obesidade) são mais prevalentes neste gênero e têm aumentado com o passar dos anos (TOOBERT *et al.*, 2007; BERGHOFER *et al.*, 2008; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015b). Berghöfer e colaboradores (2008), por exemplo, alertam para as proporções epidêmicas que a obesidade ganhou na Europa. Estes autores descrevem uma variação da prevalência para a obesidade em homens e mulheres de 4,0-28,3% e 6,2-36,5%, respectivamente.

No Brasil, estes dados são mais alarmantes. A taxa de sobrepeso no Sul de nosso país está em 54%. Este índice é maior do que a média nacional (52,5%), não apresentando diferença significativa entre os índices de homens (56,5%) e de mulheres (49,1%) reportados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os dados antropométricos e parâmetros bioquímicos dos grupos caracterizados foram analisados e fizeram parte tanto desta análise de sequenciamento quanto dos ensaios de genotipagem pelo método *TaqMan*[®] que serão apresentados no item 6.3, visto que as mesmas amostras foram utilizadas em ambos os ensaios.

A Tabela 11 apresenta os parâmetros antropométricos e laboratoriais dos 3 grupos investigados.

TABELA 11 – CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E LABORATORIAIS DE MULHERES DOS GRUPOS CTRL, ObT2DM E Ob.

PARÂMETROS	CTRL (n=141)	ObT2DM (n=130)	Ob (n=42)	<i>P</i> _{CTRL-ObT2DM}	<i>P</i> _{CTRL-Ob}	<i>P</i> _{Ob-ObT2DM}
ID (anos)	49 (44-47)	59 (52-66)	47 (44-52)	<0,001*	0,393*	<0,001*
PES (kg)	60 (56-65)	87 (80-94)	83 (78-92)	<0,001*	<0,001*	0,171*
ALT (m)	1,64 ± 6,5	1,57 ± 6,3	1,60 ± 6,8	<0,001	0,059	<0,001
IMC (kg/m ²)	23 (21-24)	35 (32-38)	32 (31-34)	<0,001*	<0,001*	<0,001*
GLU (mg/dL)	88 (82-93)	125 (103-171)	93 (85-97)	<0,001*	0,924*	<0,001*
HbA1C (%)	5,2 (4,9-5,4)	7,3 (6,5-8,8)	5,4 (4,9-5,6)	<0,001	0,986	<0,001
URE (mg/dL)	28 (23-32)	35 (30-43)	24 (21-29)	<0,001	0,532	<0,001
CRE (mg/dL)	0,70 (0,56-0,88)	0,80 (0,70-0,90)	0,60 (0,49-0,70)	<0,001*	0,369*	<0,001*
PT (g/dL)	7,1 ± 0,7	7,5 ± 0,7	6,9 ± 0,5	<0,001	0,397	<0,001
ALB (g/dL)	4,0 (3,8-4,1)	4,0 (3,9-4,3)	3,9 (3,7-4,0)	0,600*	0,224*	0,071*
COL (mg/dL)	189 (170-215)	184 (158-215)	199 (168-231)	0,632*	0,998*	0,831*
HDL-c (mg/dL)	59,1 ± 15,5	43,0 ± 10,9	56,3 ± 11,1	<0,001	0,598	<0,001
LDL-c (mg/dL)	112,0 ± 37,8	111,2 ± 40,0	109,1 ± 31,8	0,984	0,935	0,966
TRI (mg/dL)	114 (79-160)	164 (118-217)	136 (111-212)	<0,001*	0,381*	0,367*
AU (mg/dL)	4,4 (3,8-5,2)	4,9 (4,0-5,7)	5,3 (4,4-6,5)	0,090*	0,032*	0,384*

ID, idade; PES, peso; ALT, altura; IMC, índice de massa corpórea; GLU, glicemia de jejum; HbA1C, hemoglobina glicada; URE, ureia; CRE, creatinina; PT, proteína total; ALB, albumina; COL, colesterol total; HDL-c, HDL-colesterol; LDL-c, LDL-colesterol; TRI, triglicérides e AU, ácido úrico.

CTRL, mulheres saudáveis; ObT2DM, mulheres com obesidade (IMC>30 kg/m²) associado à diabetes tipo 2 e Ob, mulheres com obesidade sem a presença de diabetes

Os valores estão em média ± desvio padrão para os parâmetros que apresentaram distribuição normal ou mediana (intervalo interquartil).

P, probabilidade, o teste t de *Student* ou **Mann-Whitney U* teste. Em negrito, teste significativo (*P*<0,05).

Marcadores antropométricos II – T2DM/Ob

Idade, Peso, Altura e IMC

Estes parâmetros antropométricos foram parte importante dos critérios de seleção dos grupos (Tabela 11). Embora no planejamento inicial, não foi possível parear todos os grupos pela idade. Os grupos ObT2DM e Ob não diferem quanto ao peso (*P*=0,171), mas o IMC foi maior no grupo com presença do diabetes (*P*<0,001), uma variável que captura melhor o risco para doença cardiovascular e diabetes (SOCIEDADE-BRASILEIRA-DE-DIABETES, 2015). Este achado reforça a associação do diabetes com a obesidade em nossa população. Neste contexto, outro elemento que pode ser destacado, reside na dificuldade de obter amostras de mulheres obesas sem diabetes, o que explica o tamanho amostral deste grupo (Ob) ser menor que os demais.

O grupo com obesidade (Ob) diferiu de forma relevante de controles saudáveis apenas quanto ao peso (*P*<0,001) e IMC (*P*<0,001). As diferenças

observadas quanto a concentração de ácido úrico ($P=0,032$) podem ser consideradas pouco relevantes (Tabela 11).

O grupo com diabetes (ObT2DM) no entanto as diferenças foram expressivas em múltiplos parâmetros, o que era esperado.

Marcadores laboratoriais II – T2DM/Ob

Glucose e HbA1C

As concentrações de glucose e hemoglobina glicada foram similares entre os grupos CTRL e Ob, confirmando a classificação adequada da amostra (Tabela 11). Para o grupo ObT2DM, estes parâmetros sugerem mulheres com controle pobre da glicemia ($HbA1C > 7,0\%$ na média), uma condição muito comum entre diabéticos.

Ureia, Creatinina e Ácido Úrico

A ureia e a creatinina plasmáticas são estabelecidos marcadores da taxa de filtração glomerular renal, embora a creatinina plasmática seja mais sensível do que a ureia para medir a função renal (PERRONE; MADIAS; LEVEY, 1992; IDONIJE; OLUBA, 2011). As concentrações de ureia e creatinina foram significativamente ($P < 0,001$) maiores no grupo ObT2DM, quando comparado aos demais grupos, que não diferiram entre si ($P > 0,05$). Este achado sugere que apesar das concentrações de ambos marcadores se apresentarem no intervalo de referência, uma lesão renal precoce não pode ser descartada no grupo ObT2DM. A determinação de microalbuminúria poderia confirmar esta suposição, ensaio não disponível para o presente estudo.

O ácido úrico é um produto final do catabolismo das purinas, sendo a maior parte sintetizada no fígado e na mucosa intestinal (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2012). Conforme previamente mencionado, é conhecida a associação do ácido úrico com o DM, por meio de complicações micro e macrovasculares (KATSIKI *et al.*, 2013). A mediana do grupo CTRL apresentou valor significativamente menor quando comparada à do grupo Ob (Tabela 11). Provavelmente esse efeito seja porque concentrações maiores deste marcador são observadas em indivíduos com maior

peso. Embora isso possa ser justificado pelo fato de indivíduos com maior peso apresentarem maior concentração de ácido úrico (WALLACH, 2009), também não podemos descartar a influência do tamanho amostral. Quando as medianas dos demais grupos foram comparadas, diferenças significativas não foram observadas.

A concentração de ácido úrico foi pouco discriminante entre os grupos em estudo.

Proteína Total e Albumina

As concentrações de albumina, marcador de alterações no metabolismo proteico, geralmente estão em paralelo com as de proteínas totais, exceto quando elevações nas proteínas totais são decorrentes do incremento das γ -globulinas (WALLACH, 2009). As concentrações séricas de albumina não diferiram ($P>0,05$) entre os grupos em estudo (Tabela 11).

Em contrapartida, as concentrações de proteínas totais no grupo ObT2DM foram significativamente maiores ($P<0,001$) quando comparadas aos demais grupos (Tabela 11). Nossa hipótese se baseia no aumento da fração γ -globulina, como justificativa para este achado. A presença do diabetes favorece processos infecciosos, o que seria compatível com nossos dados (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

Também a análise conjunta destes marcadores sugere que não há perdas importantes de proteína ou mesmo que os sujeitos da pesquisa apresentem condições nutricionais inadequadas.

Perfil Lipídico

Conforme já mencionado, o DM afeta o metabolismo dos lípides, além de estar associado a eventos coronarianos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015b; SOCIEDADE-BRASILEIRA-DE-CARDIOLOGIA, 2015).

As concentrações séricas de COL, e sua principal fração no sangue o LDL-c, não diferiram entre os grupos ($P>0,05$), sugerindo que estes marcadores não foram capazes de refletir a presença do DM ou da Ob na amostra estudada (Tabela 11).

As médias dos valores de HDL-c foram significativamente menores ($P<0,001$) no grupo de diabéticas portadoras de obesidade quando comparado com os demais

grupos (Tabela 11). Concentrações menores de lipoproteína HDL, que atua no transporte reverso do colesterol, favorece a deposição deste lípide na íntima das artérias (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2015) e consequentemente maior risco para a DAC. A redução na concentração do HDL-c é comum em pacientes com diabetes, sendo reforçado em nosso estudo (WALLACH, 2009).

As medianas das concentrações de triglicérides foram significativamente menores no grupo CTRL quando comparado ao ObT2DM (Tabela 11). Porém não houve diferença significativa entre as medianas do grupo CTRL e Ob e nem do Ob com o ObT2DM (Tabela 11). Este achado reforça os triglicérides como bons marcadores das alterações associadas ao diabetes, principalmente a resistência à insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015). Elevação nas concentrações de triglicérides está reconhecidamente associadas com um maior risco para o desenvolvimento de diabetes (BITZUR *et al.*, 2009).

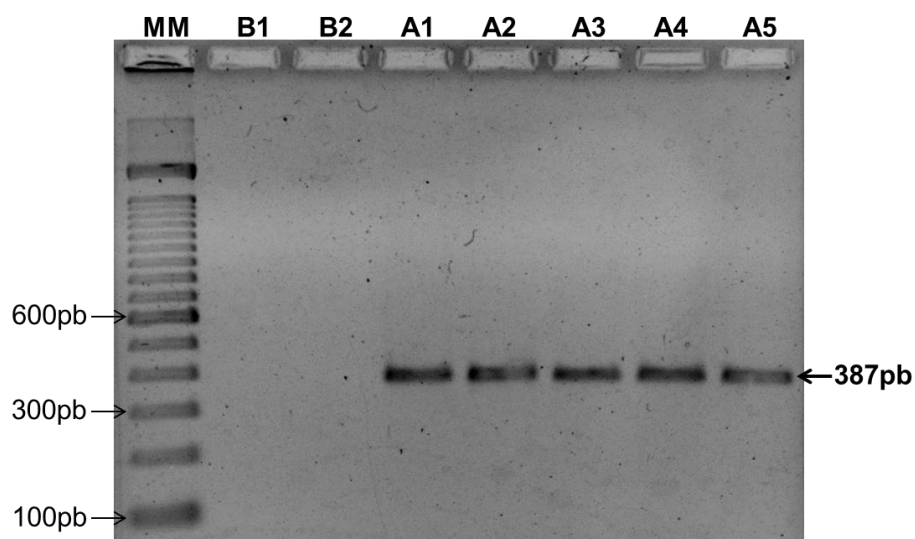
6.2.2 Análise Molecular II – *rs2268574:T>C (GCK)* – T2DM/Ob

Resultados da Reação em cadeia da Polimerase

Os primers utilizados para gerar o amplicon 2 da variante *rs2268574:T>C (GCK)*, assim como as condições de ensaio de PCR estão descritos nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

A Figura 9 representa o amplicon 2 obtido compatível com a massa molecular esperada no desenho dos primers.

FIGURA 9 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO AMPLICON 2
DA VARIANTE *rs2268574:T>C* (GCK)



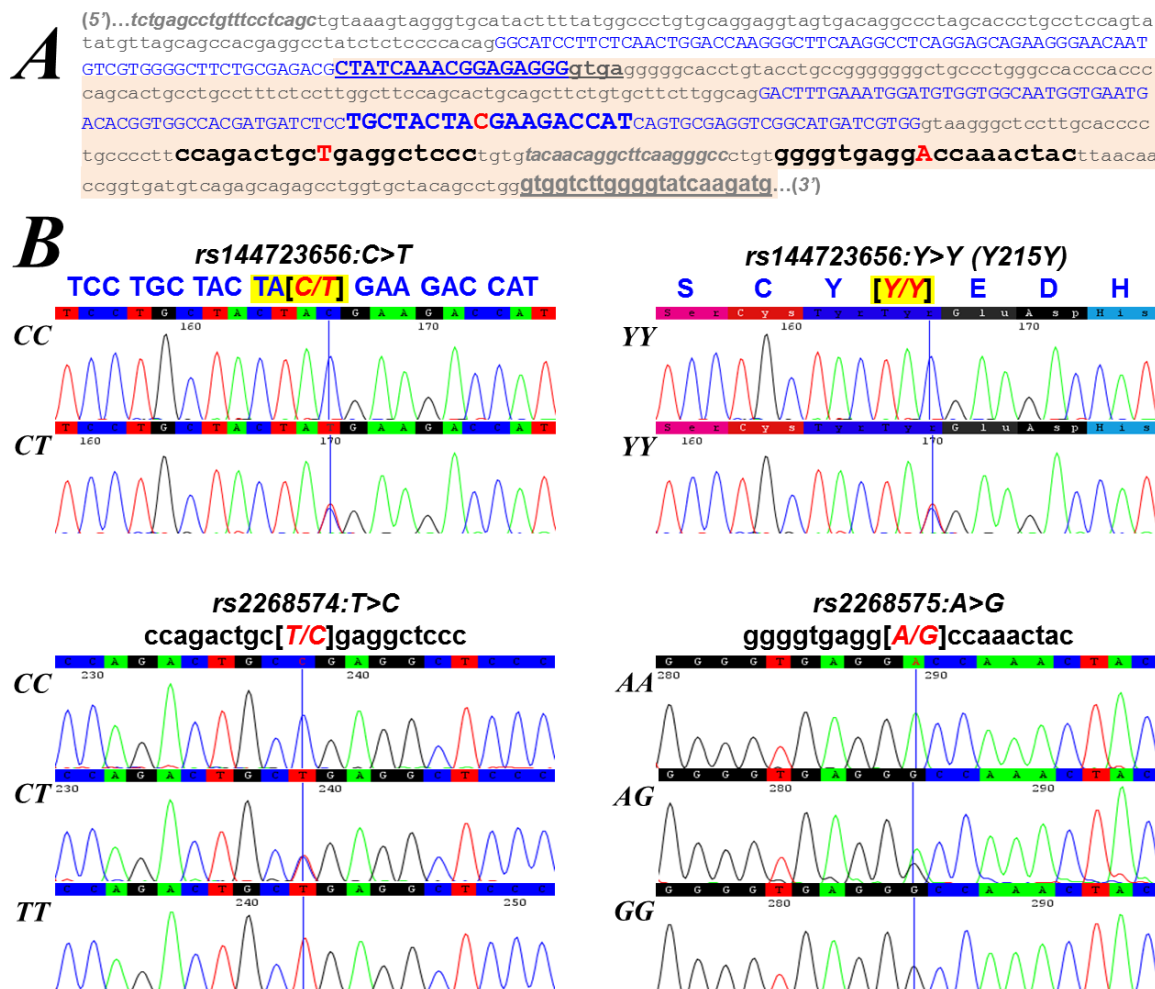
O perfil eletroforético mostra exemplo representativos do amplicon 2 para estudo do polimorfismo *rs2268574:T>C* (GCK). Gel de agarose a 2% (m/V); Tampão TBE 1X. MM, marcador de massa molecular; B1 e B2, controles negativos da reação; A1-5, amostras distintas para o respectivo amplicon.

A reação de sequenciamento foi realizada seguindo o protocolo previamente descrito na Tabela 6 (5 Material e Métodos; 5.3 Métodos utilizados; 5.3.2 Sequenciamento de DNA).

Após a obtenção e análise das sequências, 3 variações genéticas já descritas foram encontradas neste amplicon do gene *GCK*. Os polimorfismos *rs144723656:C>T* (Y215Y, éxon 6), o *rs2268574:T>C* (íntron 6, principal alvo do estudo) e o *rs2268575:A>G* (íntron 6).

Para a variante *rs144723656:C>T*, caracterizada como transversão, não foram encontrados indivíduos homozigóticos para o alelo-*T* nas amostras dos grupos estudados, o que possivelmente esteve relacionado ao tamanho amostral. Diferentemente, as outras duas variantes mostraram os três genótipos. A Figura 10 representa o segundo amplicon estudado do gene *GCK*, assim como as variações genéticas encontradas.

FIGURA 10 – VARIANTES ENCONTRADAS NO AMPLICON 2 DO GENE GCK



A. Região mostrando as seqüências de ambos os amplicons estudados. Região dos primers descritos por Tinto e colaboradores (2008), primeiro amplicon estudado (cinza, negrito e *itálico*). Região dos primers desenhados para o segundo amplicon estudado (em negrito, destaque e sublinhado). Em cor salmão, a seqüência correspondente ao segundo amplicon estudado. Azul e caixa alta, os éxons 5 e 6 do gene *GCK* (NCBI). Seqüência mostrada no(s) eletroferograma(s) (preto e negrito ou azul, caixa alta e em negrito). Variação genética (vermelho e em caixa alta). Destaque em amarelo para o códon que possui a variante *Y215Y* (ou *Tyr215Tyr*).

B. variação genética, sequência mostrada no(s) eletroferograma(s) (representação por nucleotídeos, bases ou aminoácidos, 1 letra) e eletroferograma da reação de sequenciamento (representação por nucleotídeos, bases ou aminoácidos, 3 letras). Ordem de genótipos, do mais frequente para o menos.

Variantes rs144723656:C>T, rs2268574:T>C e rs2268575:A>G do gene GCK

Embora não tenhamos encontrado na literatura informações sobre a variante *rs144723656:C>T* associada ao diabetes tipo 2 ou obesidade, ela foi associada ao *Diabetes mellitus* gestacional (ELLARD *et al.*, 2000). Porém, estes autores a reportam como sendo *Y215X*. Isso pode ser preocupante, visto que analisando as combinações possíveis, há 50% de chance de ser traduzida uma tirosina (*TAT*, *TAC*)

ou de ser gerado um códon de parada (*stop codon*, *TAA* ou *TAG*). Além deste SNP se encontrar em uma região exônica, comumente de pouca variabilidade, a possibilidade de surgir um *stop codon* também poderia justificar a ausência ou baixa frequência do genótipo homozigoto *TT*, mesmo este sendo traduzido em uma tirosina (Y).

A variante *rs2268574:T>C* está localizada a 72pb no sentido 3' da *rs144723656:C>T*, segundo a sequência obtida pelo NCBI. Exceto os nossos resultados (FRIGERI *et al.*, 2014), não encontramos estudos que avaliassem este polimorfismo em outras populações estudando diabetes e/ou obesidade. Além disso, esta variante mostrou não estar associada com o T2DM e/ou obesidade em mulheres Euro-brasileiras com idades de 40 anos ou mais. Esse resultado, embora reforce a associação deste polimorfismo com o diabetes gestacional, é intrigante, pois é provável que outros fatores devem estimular seu efeito, já que o diabetes gestacional e o tipo 2 compartilham fatores genéticos.

Próxima à variante *rs2268574:T>C*, a *rs2268575:A>G* pode ser encontrada a 47pb à região 3' da *rs2268574:T>C* (NCBI) conforme mostrado na Figura 10. Um único estudo que reportou esta variante foi encontrado (WEEDON *et al.*, 2006). Neste, embora ela tenha sido classificada como um dos *Tagging* SNPs para o gene *GCK*, não se mostrou associada com a glicemia de jejum nos diferentes grupos de indivíduos avaliados.

Sendo assim, o presente estudo é o primeiro a reportar informações mais detalhadas destes polimorfismos em indivíduos saudáveis, portadores de *Diabetes mellitus* tipo 2 e obesidade.

A Tabela 12 mostra a frequência dos genótipos dos genótipos e do alelo menor dessas 3 variantes com base em modelos genéticos com base na amostra da população estudada.

Análise de frequência dos genótipos e alelos por modelos genéticos

TABELA 12 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES DO AMPLICON 2 DO GENE GCK POR MODELOS GENÉTICOS.

GENE Variante	MG	GENÓTIPO	CTRL (n=141)	ObT2DM (n=130)	Ob (n=42)	P ₁	P ₂	P ₃
GCK <i>rs144723656</i>	CD	CC	137 (97,2)	128 (98,5)	40 (95,2)	0,468	0,539	0,228
		CT	4 (2,8)	2 (1,5)	2 (4,8)			
		TT	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)			
	DO	FAM (T) [95% IC]	1,4 [0-3]	0,8 [0-2]	2,4 [0-6]	0,471	0,542	0,231
		CC vs CT+TT	137/4	128/2	40/2			
		TT vs CC+CT	0/141	0/130	0/42			
	RE					ND	ND	ND
GCK <i>rs2268574</i>	CD	CC	46 (32,6)	42 (32,3)	15 (35,7)	0,711	0,392	0,703
		CT	69 (49,0)	59 (45,4)	16 (38,1)			
		TT	26 (18,4)	29 (22,3)	11 (26,2)			
	DO	FAM (T) [95% IC]	42,9 [37-49]	45,0 [39-51]	45,2 [35-56]	0,624	0,705	0,970
		CC vs CT+TT	46/95	42/88	15/27			
		TT vs CC+CT	26/115	29/101	11/31			
	RE					0,429	0,272	0,605
GCK <i>rs2268575</i>	CD	AA	86 (61,0)	81 (62,3)	25 (59,5)	0,711	0,862	0,947
		AG	48 (34,0)	40 (30,8)	14 (33,3)			
		GG	7 (5,0)	9 (6,9)	3 (7,2)			
	DO	FAM (G) [95% IC]	22,0 [17-27]	22,3 [17-27]	23,8 [15-33]	0,928	0,725	0,775
		AA vs AG+GG	86/55	81/49	25/17			
		GG vs AA+AG	7/134	9/121	3/39			
	RE					0,494	0,698	1,000

MG, Modelos Genéticos: CD, Codominante; DO, Dominante; RE, Recessivo. FAM, frequência do alelo menor. P₁, valor de P após comparação do grupo CTRL vs ObT2DM; P₂, CTRL vs Ob; P₃, ObT2DM vs Ob. O teste exato de Fisher *two-tailed* foi utilizado para genótipos contendo n<5. O teste de Fisher com correção de Yates foi utilizado para genótipos contendo n=0. ND, não disponível. Todas as variantes estão dentro do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os alelos menores das variantes *rs144723656:C>T*, *rs2268574:T>C* e *rs2268575:A>G* do gene GCK não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos avaliados. Dessa forma mostram não estarem associados com o diabetes tipo 2 e/ou obesidade em mulheres Euro-brasileiras, neste estudo.

Embora seja sabido que o diabetes tipo 2 compartilha fatores genéticos com o diabetes gestacional e com a obesidade, estes polimorfismos não foram associados às patologias (ObT2DM e Ob) em estudo. Porém, o fato de a variante *rs2268574:T>C* apresentar associação como GDM, conforme abordado, recomenda novos estudos com este polimorfismo com maior tamanho amostral.

Este é o primeiro trabalho a apresentar a frequência destes polimorfismos em uma amostra da população brasileira.

A Tabela 13 apresenta a comparação da frequência do alelo menor das variantes com os obtidos pelo HapMap.

TABELA 13 – COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS MENORES DAS VARIANTES DO GENE GCK COM OUTRAS POPULAÇÕES.

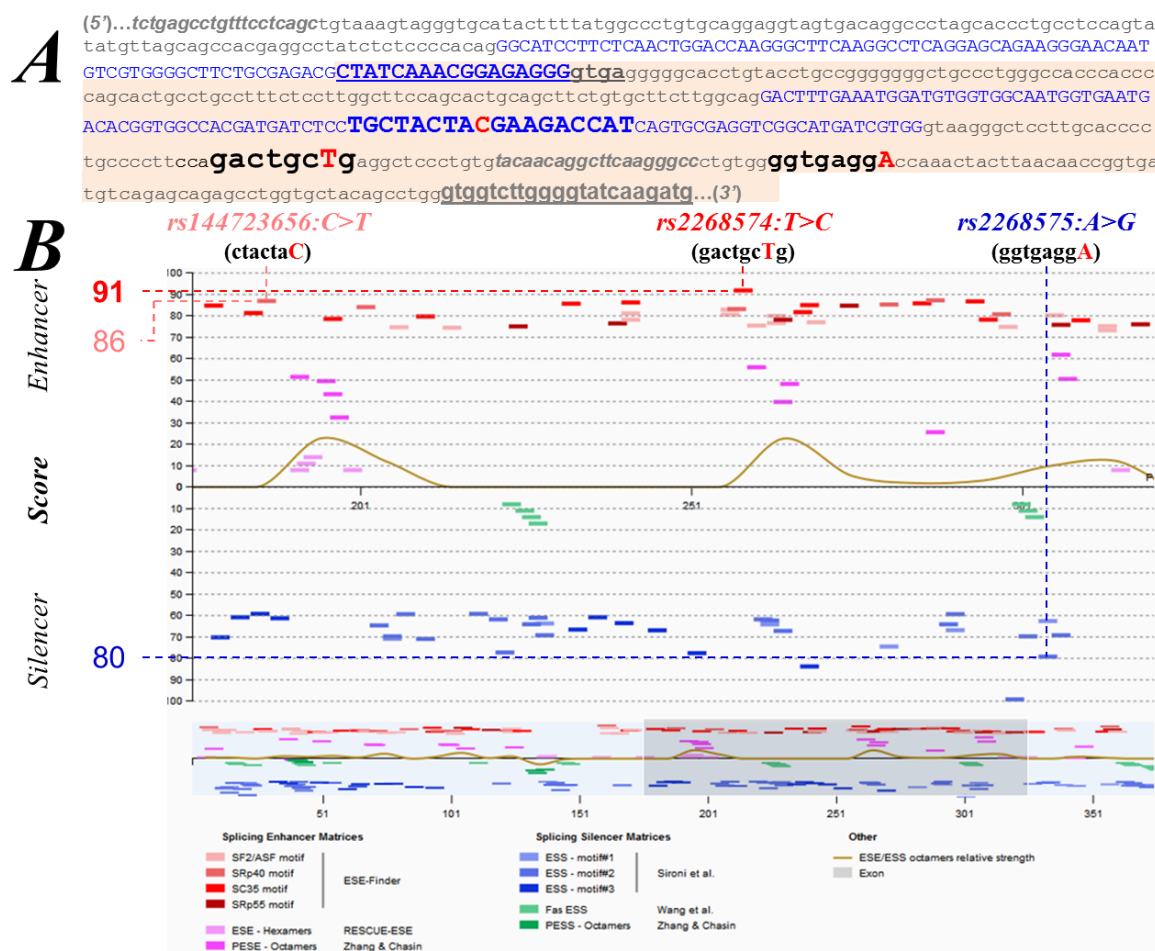
VARIANTE (ALELO MENOR)	POPULAÇÃO	FAM [95% CI]	ESTUDO
rs2268574:T/C (T)	Euro-Brasileiras	42,9 [37-49]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	43,0 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	38,6 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	26,2 [ND]	HapMap
rs2268575:A/G (G)	Euro-Brasileiras	22,0 [17-27]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	16,8 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	16,7 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	12,0 [ND]	HapMap

FAM, frequência do alelo menor (%). ND, não disponível. Não foram encontradas informações da variante localizada no éxon 6, rs144723656:C>T na literatura. HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Ambos os polimorfismos apresentaram frequência do alelo menor similar (dentro da faixa do intervalo de confiança de 95%) ao descrito em caucasianos de origem europeia e japoneses. Porém quando a frequência do alelo menor foi comparada a nigerianos Yoruban, nossa população apresentou uma frequência maior para ambas as variantes. O alelo-T de rs2268574:T>C mostrou estar aproximadamente 65% mais frequente em nossa amostra quando comparada com nigerianos, enquanto que o alelo-G da rs2268575:A>G quase chegou a estar 2x (83%) mais frequente.

Análise in silico de Splicing das variantes encontradas no amplicon 2 do gene GCK

A Figura 11 representa esta análise em detalhes.

FIGURA 11 – ANÁLISE *IN SILICO* DE *SPLICING* DO AMPLICON 2 DO GENE GCK

A. Sequencia de bases (500 pb) das regiões do intron 4-6 e exons 5-6 do gene da GCK. Em destaque *primers* desenhados por Tinto et al 2008 (italizados) e Frigeri (sublinhado).

Variação genética (vermelho e em caixa alta). Sítios de *Splicing* (destaque em fundo azul).

B. Análise gráfica do amplicon para sítios que favorecem ou não o processo de *splicing*. A linha de base central marca o índice zero (ausência de efeito). Cada retângulo no gráfico mostra uma variação genética encontrada pelo programa. A altura (0-100%) mostra a chance do sítio estar em uma região do DNA caracterizada como *Enhancer* (facilitadora de *splicing*). No sentido inverso (0-100%), avalia *Silencer* (repressora de *splicing*). Cada cor de retângulo corresponde à um desses sítios contidos no banco de dados do programa. Escores acima de $67 \pm 10\%$ usualmente identificam sítios potenciais de efetividade. Análises realizadas com o programa Human Splicing Finder (DESMET *et al.*, 2009).

As variantes *rs144723656:C>T* e *rs2268574:T>C* foram identificadas em sítios favorecedores de *splicing*, sendo que a primeira variante obteve um score de chance de 86% e a segunda de 91%.

Essa informação fica ainda mais interessante, já que o polimorfismo *rs2268574:T>C* é o que apresentou o maior score perante outros em uma sequência que apresenta um dos éxons importantes que codifica aminoácidos constituintes do sítio catalítico da enzima GCK (KAMATA *et al.*, 2004).

Porém, a variante *rs2268575:A>G* foi identificada em um sítio de ação contrária, apresentando um score de 80%. Os SNPs identificados, com os elevados escores observados nas análises *in silico*, têm potencial para novos estudos, como aqueles de expressão gênica, onde seria possível identificar o efeito funcional.

6.3 GENOTIPAGEM POR SONDAS FLUORESCENTES DO TIPO *TAQMAN*[®]

Conforme previamente abordado (Tabela 8), 11 polimorfismos foram selecionados para serem investigados nas populações em estudo.

Os 11 foram subdivididos em dois grandes grupos, composto por 8 genes no total, devido às suas características. O primeiro grupo foi composto por genes mais voltados ao *Diabetes mellitus* tipo 2, enquanto que o segundo compôs os mais voltados à obesidade. O primeiro grupo foi composto pelos genes *IGF2BP2*, *GCKR*, *TCF7L2* e *SLC30A8*. O segundo grupo pelos genes *PPARg*, *LEP*, *LEPR* e *FTO*.

A discussão dos parâmetros bioquímicos já foi abordada no item 6.2.1, visto que as mesmas amostras foram utilizadas.

A busca de associação de todas as variantes com todos os parâmetros bioquímicos foi realizada, porém não foram encontrados quaisquer efeitos das variantes genotipadas com os parâmetros antropométricos e laboratoriais escolhidos. Sendo assim, a discussão mostrada adiante se concentra mais em aspectos moleculares.

6.3.1 Análise geral dos resultados das variantes genotipadas por *TaqMan*[®]

A Tabela 14, 15 e 16 apresentam de forma detalhada os resultados das análises realizadas quando todos os grupos (CTRL vs ObT2DM, CTRL vs Ob e ObT2DM vs Ob) foram comparados. Após essa análise geral, a discussão foi realizada dentro dos 2 grandes grupos então subdivididos. O grupo 1 foi composto por polimorfismos dos genes *IGF2BP2*, *GCKR*, *TCF7L2* e *SLC30A8*. O grupo 2, por variantes dos genes *PPARg*, *LEP*, *LEPR* e *FTO*.

TABELA 14 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES SELECIONADAS PARA OS GRUPOS CTRL E ObT2DM

GENE		CTRL (n=141)					ObT2DM (n=130)					CTRL/ObT2DM	
Variante		GENÓTIPOS			FAM		GENÓTIPOS			FAM			
LC	1/2	11	12	22	P-HW	[95% IC]	11	12	22	P-HW	[95% IC]	P-GE	P-AR
PPARG													
rs1801282 (P12A) Chr3: 12351626	C/G	113 (80,2)	24 (17,0)	4 (2,8)	0,068	11,3 [8-15]	108 (83,1)	20 (15,4)	2 (1,5)	0,350	9,2 [6-13]	0,698	0,419
IGF2BP2													
rs4402960 Chr3: 185793899	G/T	65 (46,1)	61 (43,3)	15 (10,6)	0,903	32,3 [27-38]	55 (42,3)	57 (43,9)	18 (13,8)	0,602	35,8 [30-42]	0,672	0,390
GCKR													
rs780094 Chr2: 27518370	C/T	49 (34,7)	73 (51,8)	19 (13,5)	0,315	39,4 [34-45]	47 (36,1)	63 (48,5)	20 (15,4)	0,883	39,6 [34-46]	0,837	0,952
TCF7L2													
rs7901695 Chr10: 112994329	T/C	53 (37,6)	67 (47,5)	21 (14,9)	0,394	38,7 [33-44]	60 (46,2)	52 (40,0)	18 (13,8)	0,224	33,8 [28-40]	0,641	0,245
LEP													
rs7799039 Chr7: 128238730	G/A	43 (30,5)	71 (50,4)	27 (19,1)	0,810	44,3 [39-50]	47 (36,2)	64 (49,2)	19 (14,6)	0,711	39,2 [33-45]	0,475	0,230
LEPR													
rs1137100 (K109R) Chr1: 65570758	A/G	82 (58,2)	47 (33,3)	12 (8,5)	0,171	25,2 [20-30]	71 (54,6)	49 (37,7)	10 (7,7)	0,704	26,5 [21-32]	0,752	0,718
rs1137101 (Q233R) Chr1: 65592830	A/G	46 (32,6)	58 (41,1)	37 (26,3)	0,069	46,8 [41-53]	30 (23,1)	71 (54,6)	29 (22,3)	0,292	49,6 [44-56]	0,074	0,514
SLC30A8													
rs13266634 (R325W) Chr8: 117172544	C/T	82 (58,2)	46 (32,6)	13 (9,2)	0,092	25,5 [20-31]	77 (59,2)	47 (36,2)	6 (4,6)	0,729	22,7 [18-28]	0,316	0,440
FTO													
rs1421085 Chr16: 53767042	T/C	48 (34,0)	65 (46,1)	28 (19,9)	0,483	42,9 [37-49]	50 (38,5)	54 (41,5)	26 (20,0)	0,111	40,8 [35-47]	0,710	0,614
rs8050136 Chr16: 53782363	C/A	49 (34,8)	64 (45,4)	28 (19,8)	0,395	42,6 [37-48]	39 (30,0)	68 (52,3)	23 (17,7)	0,478	43,8 [38-50]	0,521	0,761
rs9930506 Chr16: 53796553	A/G	44 (31,2)	69 (48,9)	28 (19,9)	0,920	44,3 [39-50]	46 (35,4)	62 (47,7)	22 (16,9)	0,887	40,8 [35-47]	0,707	0,403

LC, localização cromossômica. 1/2, 1 alelo de maior frequência, 2 alelo de menor frequência; base sublinhada e não-sublinhada fluoróforos VIC e FAM respectivamente; P-HW, valores de P obtidos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; FAM, Frequência do Alelo Menor (%) [95% IC]; P-GE, valores de P obtidos da comparação entre os genótipos; P-AR, valores de P obtidos da comparação entre a frequência dos alelos menores.

TABELA 15 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES SELECIONADAS PARA OS GRUPOS CTRL E Ob.

GENE		CTRL (n=141)					Ob (n=42)					CTRL/Ob	
Variante		GENÓTIPOS				FAM	GENÓTIPOS				FAM		
LC	1/2	11	12	22	P-HW	[95% IC]	11	12	22	P-HW	[95% IC]	P-GE	P-AR
PPARG <i>rs1801282</i> (P12A) Chr3: 12351626	<u>C/G</u>	113 (80,2)	24 (17,0)	4 (2,8)	0,068	11,3 [8-15]	36 (85,7)	6 (14,3)	0 (0,0)	0,619	7,1 [2-13]	0,481	0,268
IGF2BP2 <i>rs4402960</i> Chr3: 185793899	<u>G/T</u>	65 (46,1)	61 (43,3)	15 (10,6)	0,903	32,3 [27-38]	19 (45,2)	17 (40,5)	6 (14,3)	0,497	34,5 [24-45]	0,803	0,699
GCKR <i>rs780094</i> Chr2: 27518370	<u>C/T</u>	49 (34,7)	73 (51,8)	19 (13,5)	0,315	39,4 [34-45]	19 (45,2)	17 (40,5)	6 (14,3)	0,497	34,5 [24-45]	0,404	0,423
TCF7L2 <i>rs7901695</i> Chr10: 112994329	<u>T/C</u>	53 (37,6)	67 (47,5)	21 (14,9)	0,394	38,7 [33-44]	14 (33,3)	22 (52,4)	6 (14,3)	0,573	40,5 [30-51]	0,850	0,764
LEP <i>rs7799039</i> Chr7: 128238730	<u>G/A</u>	43 (30,5)	71 (50,4)	27 (19,1)	0,810	44,3 [39-50]	13 (31,0)	25 (59,5)	4 (9,5)	0,108	39,3 [29-50]	0,318	0,413
LEPR <i>rs1137100</i> (K109R) Chr1: 65570758	<u>A/G</u>	82 (58,2)	47 (33,3)	12 (8,5)	0,171	25,2 [20-30]	23 (54,8)	16 (38,1)	3 (7,1)	0,924	26,2 [17-36]	0,839	0,852
<i>rs1137101</i> (Q233R) Chr1: 65592830	<u>A/G</u>	46 (32,6)	58 (41,1)	37 (26,3)	0,069	46,8 [41-53]	12 (28,6)	22 (52,4)	8 (19,0)	0,711	45,2 [35-56]	0,410	0,800
SLC30A8 <i>rs13266634</i> (R325W) Chr8: 117172544	<u>C/T</u>	82 (58,2)	46 (32,6)	13 (9,2)	0,092	25,5 [20-31]	25 (59,5)	9 (21,4)	8 (19,1)	0,002*	29,8 [20-40]	0,130	0,441
FTO <i>rs1421085</i> Chr16: 53767042	<u>T/C</u>	48 (34,0)	65 (46,1)	28 (19,9)	0,483	42,9 [37-49]	18 (42,8)	17 (40,5)	7 (16,7)	0,396	36,9 [27-47]	0,578	0,327
<i>rs8050136</i> Chr16: 53782363	<u>C/A</u>	49 (34,8)	64 (45,4)	28 (19,8)	0,395	42,6 [37-48]	17 (40,5)	17 (40,5)	8 (19,0)	0,326	39,3 [29-50]	0,786	0,594
<i>rs9930506</i> Chr16: 53796553	<u>A/G</u>	44 (31,2)	69 (48,9)	28 (19,9)	0,920	44,3 [39-50]	18 (42,8)	17 (40,5)	7 (16,7)	0,396	36,9 [27-47]	0,375	0,227

LC, localização cromossômica. 1/2, 1 alelo de maior frequência, 2 alelo de menor frequência; base sublinhada e não-sublinhada fluoróforos VIC e FAM respectivamente; P-HW, valores de P obtidos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; FAM, Frequência do Alelo Menor (%) [95% IC]; P-GE, valores de P obtidos da comparação entre os genótipos; P-AR, valores de P obtidos da comparação entre a frequência dos alelos menores. $P < 0,05$, negrito*.

TABELA 16 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES SELECIONADAS PARA OS GRUPOS ObT2DM E Ob.

GENE		ObT2DM (n=130)					Ob (n=42)					ObT2DM/Ob	
<i>Variante</i> LC	1/2	GENÓTIPOS			P-HW	FAM [95% IC]	GENÓTIPOS			P-HW	FAM [95% IC]	P-GE	P-AR
		11	12	22			11	12	22				
PPARG <i>rs1801282</i> (P12A) Chr3: 12351626	<u>C</u> /G	108 (83,1)	20 (15,4)	2 (1,5)	0,350	9,2 [6-13]	36 (85,7)	6 (14,3)	0 (0,0)	0,619	7,1 [2-13]	0,705	0,555
IGF2BP2 <i>rs4402960</i> Chr3: 185793899	<u>G</u> /T	55 (42,3)	57 (43,9)	18 (13,8)	0,602	35,8 [30-42]	19 (45,2)	17 (40,5)	6 (14,3)	0,497	34,5 [24-45]	0,927	0,836
GCKR <i>rs780094</i> Chr2: 27518370	<u>C</u> /T	47 (36,1)	63 (48,5)	20 (15,4)	0,883	39,6 [34-46]	19 (45,2)	17 (40,5)	6 (14,3)	0,497	34,5 [24-45]	0,565	0,404
TCF7L2 <i>rs7901695</i> Chr10: 112994329	T/ <u>C</u>	60 (46,2)	52 (40,0)	18 (13,8)	0,224	33,8 [28-40]	14 (33,3)	22 (52,4)	6 (14,3)	0,573	40,5 [30-51]	0,309	0,270
LEP <i>rs7799039</i> Chr7: 128238730	G/ <u>A</u>	47 (36,2)	64 (49,2)	19 (14,6)	0,711	39,2 [33-45]	13 (31,0)	25 (59,5)	4 (9,5)	0,108	39,3 [29-50]	0,470	0,993
LEPR <i>rs1137100</i> (K109R) Chr1: 65570758	<u>A</u> /G	71 (54,6)	49 (37,7)	10 (7,7)	0,704	26,5 [21-32]	23 (54,8)	16 (38,1)	3 (7,1)	0,924	26,2 [17-36]	0,993	0,950
<i>rs1137101</i> (Q233R) Chr1: 65592830	<u>A</u> /G	30 (23,1)	71 (54,6)	29 (22,3)	0,292	49,6 [44-56]	12 (28,6)	22 (52,4)	8 (19,0)	0,711	45,2 [35-56]	0,749	0,485
SLC30A8 <i>rs13266634</i> (R325W) Chr8: 117172544	<u>C</u> /T	77 (59,2)	47 (36,2)	6 (4,6)	0,729	22,7 [18-28]	25 (59,5)	9 (21,4)	8 (19,1)	0,002*	29,8 [20-40]	0,006*	0,190
FTO <i>rs1421085</i> Chr16: 53767042	T/ <u>C</u>	50 (38,5)	54 (41,5)	26 (20,0)	0,111	40,8 [35-47]	18 (42,8)	17 (40,5)	7 (16,7)	0,396	36,9 [27-47]	0,840	0,529
<i>rs8050136</i> Chr16: 53782363	C/ <u>A</u>	39 (30,0)	68 (52,3)	23 (17,7)	0,478	43,8 [38-50]	17 (40,5)	17 (40,5)	8 (19,0)	0,326	39,3 [29-50]	0,368	0,463
<i>rs9930506</i> Chr16: 53796553	<u>A</u> /G	46 (35,4)	62 (47,7)	22 (16,9)	0,887	40,8 [35-47]	18 (42,8)	17 (40,5)	7 (16,7)	0,396	36,9 [27-47]	0,658	0,529

LC, localização cromossômica. 1/2, 1 alelo de maior frequência, 2 alelo de menor frequência; base sublinhada e não-sublinhada fluoróforos VIC e FAM respectivamente; *P-HW*, valores de *P* obtidos do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*; FAM, Frequência do Alelo Menor (%) [95% IC]; *P-GE*, valores de *P* obtidos da comparação entre os genótipos; *P-AR*, valores de *P* obtidos da comparação entre a frequência dos alelos menores. *P*<0,05, negrito*.

A variante *rs13266634:C>T* (*SLC30A8*) foi a única que não se encontrou dentro do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Tabelas 15 e 16). Após todos os resultados de genotipagem terem sido reavaliados, acreditamos que este resultado seja um reflexo do tamanho amostral do grupo Ob, uma vez que, quando esta variante foi

comparada nos grupos CTRL com ObT2DM (Tabela 14), o equilíbrio foi reestabelecido. O fator “ao acaso/casualidade” também pode estar influenciando esses resultados.

Além disso, esta mesma variante mostrou uma diferença significativa entre os genótipos quando os grupos ObT2DM e Ob foram comparados (Tabela 16). Mais uma vez, acreditamos que este efeito foi decorrente do número amostral e casualidade do grupo Ob, influenciando estes resultados.

6.3.2 Análise dos resultados das variantes genotipadas por modelos genéticos

Como os polimorfismos estudados mostraram não estarem associados ao *Diabetes mellitus* tipo 2 e/ou obesidade na amostra da população estudada, uma análise ampliada buscando combinar (somar) alelos foi realizada na tentativa de avaliar este efeito.

As Tabelas 17 e 18 apresentam os resultados obtidos por meio de análise por modelos genéticos, codominante (cerne da análise anteriormente apresentada), dominante e recessivo (acrescentados).

A Tabela 17 apresenta as frequências genotípicas e alélicas das variantes dos genes *IGF2BP2*, *GCKR*, *TCF7L2* e *SLC30A8* obtidas após essas análises.

TABELA 17 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES DOS GENES *IGF2BP2*, *GCKR*, *TCF7L2* E *SLC30A8* POR MODELOS GENÉTICOS.

GENE Variante	MG	GENÓTIPO	CTRL (n=141)	ObT2DM (n=130)	Ob (n=42)	P_1	P_2	P_3
<i>IGF2BP2</i> <i>rs4402960</i>	CD	GG	65 (46,1)	55 (42,3)	19 (45,2)	0,672	0,803	0,927
		GT	61 (43,3)	57 (43,9)	17 (40,5)			
		TT	15 (10,6)	18 (13,8)	6 (14,3)	0,390	0,699	0,836
		FAM (T) [95% IC]	32,3 [27-38]	35,8 [30-42]	34,5 [24-45]			
	DO	GG vs GT+TT	65/76	55/75	19/23	0,530	0,922	0,739
	RE	TT vs GG+GT	15/126	18/112	6/36	0,420	0,515	0,943
<i>GCKR</i> <i>rs780094</i>	CD	CC	49 (34,7)	47 (36,1)	19 (45,2)	0,837	0,404	0,565
		CT	73 (51,8)	63 (48,5)	17 (40,5)			
		TT	19 (13,5)	20 (15,4)	6 (14,3)	0,952	0,423	0,404
		FAM (T) [95% IC]	39,4 [34-45]	39,6 [34-46]	34,5 [24-45]			
	DO	CC vs CT+TT	49/92	47/83	19/23	0,810	0,217	0,293
	RE	TT vs CC+CT	19/122	20/110	6/36	0,655	0,893	0,863
<i>TCF7L2</i> <i>rs7901695</i>	CD	TT	53 (37,6)	60 (46,2)	14 (33,3)	0,641	0,850	0,309
		TC	67 (47,5)	52 (40,0)	22 (52,4)			
		CC	21 (14,9)	18 (13,8)	6 (14,3)	0,245	0,764	0,270
		FAM (C) [95% IC]	38,7 [33-44]	33,8 [28-40]	40,5 [30-51]			
	DO	TT vs TC+CC	53/88	60/70	14/28	0,153	0,615	0,145
	RE	CC vs TT+TC	21/120	18/112	6/36	0,806	0,922	0,943
<i>SLC30A8</i> <i>rs13266634</i>	CD	CC	82 (58,2)	77 (59,2)	25 (59,5)	0,316	0,130	0,006*
		CT	46 (32,6)	47 (36,2)	9 (21,4)			
		TT	13 (9,2)	6 (4,6)	8 (19,1)	0,440	0,441	0,190
		FAM (T) [95% IC]	25,5 [20-31]	22,7 [18-28]	29,8 [20-40]			
	DO	CC vs CT+TT	82/59	77/53	25/17	0,858	0,875	0,973
	RE	TT vs CC+CT	13/128	6/124	8/34	0,138	0,079	0,030*

MG, Modelos Genéticos: CD, Codominante; DO, Dominante; RE, Recessivo. FAM, frequência do alelo menor. P_1 , valor de P após comparação do grupo CTRL vs ObT2DM; P_2 , CTRL vs Ob; P_3 , ObT2DM vs Ob. $P < 0,05$, negrito*.

O tamanho amostral, relativamente pequeno, pode ter contribuído para a associação significativa, em P_3 (modelos CD e RE) observado na Tabela 17. Forte indício deste efeito pode ser visto na própria tabela em P_1 e P_2 , quando um maior número de indivíduos (CTRL) parece ajustar este resultado estatístico, minimizando o efeito gerado nos grupos com número amostral menor (ObT2DM e Ob) quando comparados.

Nenhuma diferença significativa foi observada nas variações genéticas apresentadas na Tabela 18. Esta apresenta as frequências genotípicas e alélicas das variantes dos genes *PPARG*, *LEP*, *LEPR* e *FTO* obtidas após essas análises.

TABELA 18 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DAS VARIANTES DOS GENES *PPARg*, *LEP*, *LEPR* E *FTO* POR MODELOS GENÉTICOS.

GENE Variante	MG	GENÓTIPO	CTRL (n=141)	ObT2DM (n=130)	Ob (n=42)	P ₁	P ₂	P ₃
PPARg rs1801282	CD	CC	113 (80,2)	108 (83,1)	36 (85,7)	0,705	0,481*	0,705*
		CG	24 (17,0)	20 (15,4)	6 (14,3)			
		GG	4 (2,8)	2 (1,5)	0 (0,0)			
	DO	FAM (G) [95% IC]	11,3 [8-15]	38,5 [33-44]	7,1 [2-13]	0,419	0,268	0,555
		CC vs CG+GG	113/28	108/22	36/6			
		GG vs CC+CG	4/137	2/128	0/42			
	RE	GG	43 (30,5)	47 (36,2)	13 (31,0)	0,686	0,615*	0,985*
LEP rs7799039	CD	GA	71 (50,4)	64 (49,2)	25 (59,5)	0,475	0,318*	0,470*
		AA	27 (19,1)	19 (14,6)	4 (9,5)			
		FAM (A) [95% IC]	44,3 [39-50]	39,2 [33-45]	39,3 [29-50]			
	DO	GG vs GA+AA	43/98	47/83	13/29	0,323	0,955	0,539
	RE	AA vs GG+GA	27/114	19/111	4/38	0,321	0,167*	0,602*
	CD	AA	82 (58,2)	71 (54,6)	23 (54,8)	0,752	0,839*	0,993*
		AG	47 (33,3)	49 (37,7)	16 (38,1)			
		GG	12 (8,5)	10 (7,7)	3 (7,1)			
LEPR rs1137100	DO	FAM (G) [95% IC]	25,2 [20-30]	26,5 [21-32]	26,2 [17-36]	0,718	0,852	0,950
		AA vs AG+GG	82/59	71/59	23/19			
		GG vs AA+AG	12/129	10/120	3/39			
	RE	AA	46 (32,6)	30 (23,1)	12 (28,6)	0,805	1,000*	1,000*
	CD	AG	58 (41,1)	71 (54,6)	22 (52,4)	0,074	0,410	0,749
		GG	37 (26,3)	29 (22,3)	8 (19,0)			
		FAM (G) [95% IC]	46,8 [41-53]	49,6 [44-56]	45,2 [35-56]			
rs1137101	DO	AA vs AG+GG	46/95	30/100	12/30	0,081	0,620	0,471
	RE	GG vs AA+AG	37/104	29/101	8/34	0,451	0,342	0,655
FTO rs1421085	CD	TT	48 (34,0)	50 (38,5)	18 (42,8)	0,710	0,578	0,840
		TC	65 (46,1)	54 (41,5)	17 (40,5)			
		CC	28 (19,9)	26 (20,0)	7 (16,7)			
	DO	FAM (C) [95% IC]	42,9 [37-49]	40,8 [35-47]	36,9 [27-47]	0,614	0,327	0,529
		TT vs TC+CC	48/93	50/80	18/24			
		CC vs TT+TC	28/113	26/104	7/35			
	RE	CC	49 (34,8)	39 (30,0)	17 (40,5)	0,968	0,644	0,633
rs8050136	CD	CA	64 (45,4)	68 (52,3)	17 (40,5)	0,521	0,786	0,368
		AA	28 (19,8)	23 (17,7)	8 (19,0)			
		FAM (A) [95% IC]	42,6 [37-48]	43,8 [38-50]	39,3 [29-50]			
	DO	CC vs CA+AA	49/92	39/91	17/25	0,404	0,498	0,208
	RE	AA vs CC+CA	28/113	23/107	8/34	0,649	0,908	0,843
	CD	AA	44 (31,2)	46 (35,4)	18 (42,8)	0,707	0,375	0,658
		AG	69 (48,9)	62 (47,7)	17 (40,5)			
		GG	28 (19,9)	22 (16,9)	7 (16,7)			
rs9930506	DO	FAM (G) [95% IC]	44,3 [39-50]	40,8 [35-47]	36,9 [27-47]	0,403	0,227	0,529
		AA vs AG+GG	44/97	46/84	18/24			
		GG vs AA+AG	28/113	22/108	7/35			
	RE	GG	28/113	22/108	7/35	0,534	0,644	0,969

MG, Modelos Genéticos: CD, Codominante; DO, Dominante; RE, Recessivo. FAM, frequência do alelo menor. P₁, valor de P após comparação do grupo CTRL vs ObT2DM; P₂, CTRL vs Ob; P₃, ObT2DM vs Ob. *O teste exato de Fisher two-tailed foi utilizado quando um dos genótipos foi <5 e a correção de Yates foi aplicada quando não foi identificado elementos de um genótipo (n=0).

Após terem sido obtidas as frequências dos alelos menores do grupo de saudáveis, estes foram comparados com a literatura.

6.3.3 Comparação da frequência do alelo menor dos genes *IGF2BP2*, *GCKR*, *TCF7L2* e *SLC30A8* com outras populações

A Tabela 19 mostra a frequência do alelo menor do primeiro grupo de genes (*IGF2BP2*, *GCKR*, *TCF7L2* e *SLC30A8*) desta e de outras populações.

TABELA 19 – COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS MENORES DOS GENES *IGF2BP2*, *GCKR*, *TCF7L2* E *SLC30A8* COM OUTRAS POPULAÇÕES.

GENE / VARIANTES (AM)	POPULAÇÃO	FAM [95% IC]	ESTUDOS
<i>IGF2BP2</i> / rs4402960 (T)	Euro-Brasileiras	32,3 [27-38]	Este estudo
	Caucasianas da Dinamarca	30,2 [29-31]	(GRARUP <i>et al.</i> , 2007)
	Asiáticas da Índia	48,5 [46-51]	(KOMMOJU <i>et al.</i> , 2013)
	Nigerianos Yoruban	54,1 [ND]	HapMap
<i>GCKR</i> / rs780094 (T)	Euro-Brasileiras	39,4 [34-45]	Este estudo
	Caucasianas da Dinamarca	34,8 [34-36]	(SPARSO <i>et al.</i> , 2008)
	Asiáticas da China	54,3 [52-56]	(CAO <i>et al.</i> , 2011)
	Nigerianos Yoruban	11,9 [ND]	HapMap
<i>TCF7L2</i> / rs7901695 (C)	Euro-Brasileiras	38,7 [33-44]	Este estudo
	Caucasianas norte-Suecas	22,8 [21-25]	(MAYANS <i>et al.</i> , 2007)
	Asiáticas do Japão	4,4 [3-5]	(HAYASHI <i>et al.</i> , 2007)
	Nigerianos Yoruban	45,6 [ND]	HapMap
<i>SLC30A8</i> / rs13266634 (T) (325W)	Euro-Brasileiras	25,5 [20-31]	Este estudo
	Caucasianas da Polônia	33,0 [28-38]	(KURZAWSKI <i>et al.</i> , 2012)
	Asiáticas da China	43,4 [38-49]	(ZHENG <i>et al.</i> , 2011)
	Nigerianos Yoruban	6,1 [ND]	HapMap

AM, alelo menor. FAM [95% IC], frequência do alelo menor em porcentagem com intervalo de confiança de 95%. ND, não disponível.

HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>)

As frequências genotípicas e alélicas de todas as variantes estudadas não diferiram entre os grupos estudados ($P > 0,05$). As frequências de alelos menor (FAM) das variantes do presente estudo foram similares quando comparadas com outros caucasianos, conforme mostrado na Tabela 19. As semelhanças observadas podem ser devido à herança genética compartilhada por essas populações. Uma exceção

foi observada no polimorfismo *rs7901695:T>C* (*TCF7L2*), o qual apresentou uma menor frequência para o alelo-C desta variante em caucasianas do norte da Suécia. Este resultado pode ser explicado pelo fato de a população do norte da Suécia ser etnicamente mais homogênea quando comparada com a brasileira.

Para todos os outros polimorfismos estudados as FAMs foram diferentes quando comparadas com a população Asiática e Yoruban, provavelmente devido às diferenças genéticas que essas populações apresentam.

6.3.4 Análise molecular – Genes *IGF2BP2*, *GCKR*, *TCF7L2* e *SLC30A8* e associação com o T2DM e Obesidade

IGF2BP2

O gene *IGF2BP2* tem seu envolvimento no metabolismo da glucose por afetar a secreção de insulina, porém sua variante *rs4402960:G>T* tem mostrado resultados conflitantes quanto a associação com o diabetes tipo 2 (KOMMOJU *et al.*, 2013). Grarup e colaboradores (2007) validaram a associação desta variante para o T2DM estudando dinamarqueses. Entretanto, e de acordo com nossos resultados, este polimorfismo não foi associado com caucasianos franceses conforme descrito por Duesing e colegas (2008) depois de terem investigado cerca de 3.000 indivíduos. Estes autores relataram a inabilidade em confirmar a associação desta variante com diabetes tipo 2 pôde ter sido atribuída à falta de poder estatístico, uma vez que este polimorfismo apresenta um modesto sinal de associação. Além disso, descreveram que um poder $\geq 90\%$ (poder de cálculo estatístico, *power calculation*) pode ser adequado para observar essa associação não encontrada.

Com base nisso, essa mesma condição pareceu ser o principal contribuinte em nossos resultados. Em contrapartida, em uma meta-análise realizada por Zhao e colaboradores (2012), os autores mostraram a variante *rs4402960:G>T* associada com o risco elevado para o desenvolvimento do diabetes tipo 2, sendo este achado explicado pela variabilidade étnica (KOMMOJU *et al.*, 2013).

GCKR

O gene *GCKR* contribui para a homeostase da glicose (IRWIN; TAN, 2014). Seu polimorfismo, *rs780094:C>T*, tem sido associado ao risco para o diabetes tipo 2 e dislipidemia tanto em indivíduos da etnia Han quanto em brancos europeus. Em indivíduos Han, este mecanismo de associação não foi descrito como sendo por meio da obesidade, mas sim pela prejudicada função das células-beta pancreáticas (QI *et al.*, 2009). Sparso e colaboradores (2008) mostraram que este polimorfismo reduz o risco de dinamarqueses desenvolverem T2DM. Estes autores descreveram que a variante *rs780094:C>T* pode aumentar a atividade da proteína reguladora da glucoquinase, GCKRP. Uma alteração no gene *GCKR* pode diminuir a estabilidade da GCKRP no fígado e, conseqüentemente, a perda de função da enzima GCK e sua degradação, comprometendo assim a homeostase da glicose (IRWIN; TAN, 2014). Estes mesmos autores ressaltam que a forma hiperativada da enzima GCKRP pode contribuir para melhorar a concentração da glicose no sangue em indivíduos com diabetes tipo 2.

Em nosso estudo, no entanto, não encontramos associação significativa desta variante com biomarcadores laboratoriais. Isso pode ter sido decorrente dela estar localizada em uma região contendo um grande bloco de haplótipos (~500kb) em que vários outros genes podem ser encontrados. Por esta razão, ainda acaba sendo questionável que a variante intrônica *rs780094:C>T* possa ser a única responsável pelas alterações metabólicas mencionadas (SPARSO *et al.*, 2008).

TCF7L2

Grant e colaboradores foram os primeiros a descreverem o gene *TCF7L2* como portador de risco para T2DM em um estudo caso-controle de coorte islandês, replicado em outros estudos de coorte dinamarqueses e norte-americanos (GRANT *et al.*, 2006). Este gene foi descrito associado com o diabetes tipo 2 em múltiplos grupos étnicos (TONG *et al.*, 2009). Esses autores realizaram uma meta-análise avaliando 36 estudos para investigar associação de polimorfismos do gene *TCF7L2* com o T2DM em diversas etnias. A variante de *rs7901695:T>C (IVS3T>C)* localizada no intron 3 estava entre as variantes associadas com o diabetes tipo 2 mais estudadas. Investigando indivíduos Amish diabéticos tipo 2, Damcott e

colaboradores (2006) reportaram a variante *rs7901695:T>C* associada à resistência à insulina em indivíduos brancos. Sugeriram que o gene *TCF7L2* desempenha sua função na regulação de outros genes envolvidos na sensibilidade à insulina e a liberação deste hormônio estimulada pela glucose. O *TCF7L2* também regula a expressão do gene de proglucagon por um provável sítio de ligação do TCF localizado na região promotora deste gene. A proteína codificada pelo gene do proglucagon é enzimaticamente clivada e convertida em uma molécula denominada peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1). Este é secretado por células-L endócrinas localizadas no intestino e contribui para a homeostase da glucose (YI, F.; BRUBAKER; JIN, 2005).

Em nosso estudo, não observamos associação desta variante com biomarcadores laboratoriais. O mecanismo através do qual o *TCF7L2* induz a susceptibilidade ao diabetes tipo 2 ainda não esteja bem esclarecida. Além disso, mais de 60 genes-alvo ativados pelo complexo beta-catenina/TCF-4 tem sido descrito, sendo eles os prováveis contribuintes em potencial para o desenvolvimento do T2DM da obesidade (DAMCOTT *et al.*, 2006). Assim sendo, a variante intrônica de *rs7901695:T>C* não parece ser o principal fator para as patologias estudadas neste presente estudo.

SLC30A8

O gene *SLC30A8* codifica para o transportador 8 de zinco (Zn-T8) que tem importante função no processo de síntese e secreção da insulina (CHAUSMER, 1998). O polimorfismo *rs13266634:C>T (R325W)* localizado no último éxon (éxon 11) do gene *SLC30A8* é uma variante não sinônima (WEIJERS, 2010) da qual o alelo-C (*R325*) foi relatado como fortemente associado com a susceptibilidade ao T2DM em franceses (ZHENG *et al.*, 2011), além de estudos de replicação europeus e do leste asiático (CAUCHI *et al.*, 2010). Estes resultados podem ser justificados pela carga positiva (*R325*) adicionada em sítios específicos do Zn-T8 estruturalmente importantes para ligação de íons de zinco. Esta condição pode afetar o transporte destes íons e o recrutamento de enzimas metalochaperonas dependentes de zinco. Dessa forma, portadores de *R325* podem, por acumulação de zinco, possuir um armazenamento de insulina, nos grânulos das células-beta pancreáticas, menos eficiente (NICOLSON *et al.*, 2009). Em contrapartida a variante

rs13266634:C>T não foi encontrada associada em africanos, indianos, marroquinos e israelenses (CAUCHI *et al.*, 2010).

De forma similar, também observamos uma não associação deste polimorfismo em nossa amostra populacional. Isso pode ser porque, conforme reportado, a troca do aminoácido gerada por este polimorfismo não compromete a transferência adequada de ions zinco, para seus locais corretos localizados nas células-beta (WEIJERS, 2010).

Após essa discussão vimos que os genes do grupo 1, mais associados com diabetes tipo 2, não mostraram a FAM associada com esta forma de diabetes e/ou obesidade. A partir de agora, serão discutidas essas frequências com outras populações do segundo grupo de genes.

6.3.5 Comparação da frequência do alelo menor dos genes *PPARg*, *LEP*, *LEPR* e *FTO* com outras populações

A Tabela 20 apresenta a frequência do alelo menor do segundo grupo de genes (*PPARg*, *LEP*, *LEPR* e *FTO*) desta e de outras populações.

TABELA 20 – COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS MENORES DOS GENES *PPARg*, *LEP*, *LEPR* e *FTO* COM OUTRAS POPULAÇÕES.

GENE / VARIANTES (AM)	POPULAÇÃO	FAM [95% IC]	ESTUDOS
<i>PPARg</i> / rs1801282 (G) (12A)	Euro-Brasileiras	11,3 [8-15]	Este estudo (MEMISOGLU <i>et al.</i> , 2002) (YAMAMOTO <i>et al.</i> , 2002) HapMap
	Caucasianas dos E.U.A.	11,0 [9-13]	
	Asiáticos do Japão	3,0 [1-4]	
	Nigerianos Yoruban	0,0 [ND]	
<i>LEP</i> / rs7799039 (G)	Euro-Brasileiras	44,3 [39-50]	Este estudo (OPGEN-RHEIN <i>et al.</i> , 2010) (WU <i>et al.</i> , 2011) HapMap
	Caucasianos alemães	58,3 [50-67]	
	Asiáticos da China	30,0 [23-37]	
	Nigerianos Yoruban	98,7 [ND]	
<i>LEPR</i> / rs1137100 (G) (109R)	Euro-Brasileiras	25,2 [20-30]	Este estudo (WAUTERS <i>et al.</i> , 2001) (MATSUOKA <i>et al.</i> , 1997) HapMap
	Caucasianas belgas	28,3 [39-50]	
	Asiáticos do Japão	78,0 [70-75]	
	Nigerianos Yoruban	16,5 [ND]	
<i>LEPR</i> / rs1137101 (G) (223R)	Euro-Brasileiras	46,8 [41-53]	Este estudo (QUINTON <i>et al.</i> , 2001) (ENDO <i>et al.</i> , 2000) HapMap
	Caucasianas inglesas	41,0 [31-52]	
	Asiáticos do Japão	85,0 [82-88]	
	Nigerianos Yoruban	59,7 [ND]	
<i>FTO</i> / rs8050136 (C)	Euro-Brasileiras	42,6 [37-48]	Este estudo (HINNEY <i>et al.</i> , 2007) (LIU <i>et al.</i> , 2010) HapMap
	Caucasianos alemães	37,8 [35-42]	
	Asiáticos (chineses Han)	10,8 [9-12]	
	Nigerianos Yoruban	54,0 [ND]	
<i>FTO</i> / rs1421085 (C)	Euro-Brasileiras	42,9 [37-49]	Este estudo (DINA <i>et al.</i> , 2007) (CHA <i>et al.</i> , 2008) HapMap
	Caucasianos europeus	41,2 [40-43]	
	Asiáticas coreanas	14,2 [13-16]	
	Nigerianos Yoruban	6,6 [ND]	
<i>FTO</i> / rs9930506 (G)	Euro-Brasileiras	44,3 [39-50]	Este estudo (SENTINELLI <i>et al.</i> , 2012) (SUN <i>et al.</i> , 2012) HapMap
	Caucasianos da Itália	43,4 [39-48]	
	Asiáticos de Beijing (China)	17,4 [15-20]	
	Nigerianos Yoruban	19,0 [ND]	

AM, alelo menor. FAM [95% IC], frequência do alelo menor em porcentagem com intervalo de confiança de 95%. ND, não disponível.

HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>)

As frequências de alelos menores das variantes do presente estudo foram similares às de outros estudos com caucasianos, porém quando comparadas com as de outros grupos étnicos foram divergentes (Tabela 20).

As FAMs observadas em nosso estudo foram diferentes quando comparados com as encontradas em asiáticos. Para os polimorfismos dos genes *PPARg*, *LEP*, e *FTO*, a FAM de asiáticos foram significativamente menores do que encontramos.

Porém, a do gene *LEPR* foi uma exceção, apresentando uma frequência maior. A população Yoruban (Nigéria) apresentou FAMs mais altas para *LEP* (*rs7799039*), *LEPR* (*rs1137101*), *FTO* (*rs8050136*) e FAMs menores para os *PPARg*, *LEPR* (*rs1137100*), *FTO* (*rs1421085* e *rs9930506*).

6.3.6 Análise molecular – Genes *PPARg*, *LEP*, *LEPR* e *FTO* e associação com o T2DM e Obesidade

PPARg

A variante *rs1801282:C>G* (*CCA>GCA*, *P12A*), um polimorfismo missense descrito em 1997, está localizada no éxon B (códon 12, na posição *C34G*) do gene *PPARg*. Este éxon codifica para resíduos de aminoácidos N-terminais, que definem a isoforma *PPARg2* específica de adipócitos (YEN *et al.*, 1997; STUMVOLL; HARING, 2002). O alelo-12A foi descrito como um sendo protetor para o diabetes. Este alelo pode diminuir a afinidade de ligação da isoforma *PPARg2* a elementos responsivos conhecidos como *predicted peroxisome proliferator response element*, ou apenas elementos *PPRE* (DEEB *et al.*, 1998; MASUGI *et al.*, 2000). Além disso, neste mecanismo, a heterodimerização da isoforma *PPARg2* com o receptor X do ácido retinoico (outro fator de transcrição) é também afetada, comprometendo a ativação da transcrição de genes-alvo envolvidos no controle do metabolismo (SPIEGELMAN, 1998). O polimorfismo *rs1801282:C>G* foi associado com reduzidos valores de IMC e com a melhora da sensibilidade à insulina em finlandeses de meia-idade e idosos, além de também mostrar uma associação do genótipo CC com T2DM em americanos de origem japonesa (DEEB *et al.*, 1998).

Em nossa amostra populacional, não foi encontrada associação desta variação genética com o diabetes tipo 2 e obesidade. Uma explicação provável é que para que ela tenha um efeito modesto, um grande tamanho amostral seria necessário (ALTSHULER *et al.*, 2000).

LEP

A variante *rs7799039:G>A* (*G-2548A*) está localizada na região promotora do gene da leptina humana, o qual regula a homeostase energética. Esta variante foi

associada com risco aumentado para o desenvolvimento da obesidade em adolescentes do sexo masculino provenientes da Malásia (NG *et al.*, 2014). Recentemente, Luperini e colaboradores (2015) investigando brasileiras brancas portadoras de obesidade mórbida ($\text{IMC} > 40 \text{ kg/m}^2$) não encontraram associação desse polimorfismo com a obesidade.

A FAM encontrada por eles foi similar às que encontramos em nosso estudo também composto apenas por mulheres e nós não encontramos associação desta variante com portadoras de T2DM obesas.

LEPR

Os polimorfismos *rs1137100:A>G* (Q109R) e *rs1137101:A>G* (Q223R) polimorfismos do gene *LEPR* mudam a estrutura do receptor de leptina e podem levar ao desenvolvimento do T2DM através de mecanismos relacionados com a obesidade (SALOPURO *et al.*, 2005; HEBER; CARPENTER, 2011). Tabassum e colaboradores (2012) estudando crianças indianas, e Furusawa e colaboradores (2010) investigando moradores de ilhas do Pacífico, observaram associação com a obesidade somente em portadores do alelo-223R (*rs1137101:A>G*). De forma similar ao que encontramos, Stratigopoulos e colaboradores (2009) descreveram nenhum efeito no IMC para o alelo-109R (*rs1137100:A>G*). Além disso, estes mesmos autores descreveram que o alelo-223R (*rs1137101:A>G*) não desempenha uma função significativa na regulação da adiposidade humana porque o resíduo de aminoácido arginina (R) é encontrado em um domínio que não afeta a ligação da leptina e, conseqüentemente sua sinalização.

Assim como em nosso estudo, Luperini e colaboradores (2015) também estudaram esta variante e também não encontraram associação deste polimorfismo com a obesidade em mulheres. Os nossos resultados sugerem que o diabetes tipo 2 também não esteja associado com este polimorfismo.

FTO

Os polimorfismos *rs1421085:T>C*, *rs8050136:C>A* e *rs9930506:A>G* do gene *FTO* foram descritos associados com o IMC (CHAUHAN *et al.*, 2011). O alelo-C da variante *rs1421085:T>C* foi encontrado associado com o aumento do IMC na

população coreana (CHA *et al.*, 2008). A variante *rs8050136:C>A* foi caracterizada como uma das variações genéticas com pequeno (<5%), mas significativo impacto na hereditariedade do T2DM (CHA *et al.*, 2008). O genótipo GG do polimorfismo *rs9930506:A>G* foi considerado como um fator de risco para sobrepeso e obesidade em um estudo de coorte espanhol (COTO *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, todas essas variantes do gene *FTO* não mostram associação significativa com o *Diabetes mellitus* tipo 2 e/ou com a obesidade. Este resultado pode ser devido tanto ao nosso tamanho amostral quanto às diferenças de herança genética quando comparamos nossa população com as demais.

Em síntese, nosso estudo mostrou que as variações genéticas do primeiro grupo de genes *rs4402960:G>T* (*IGF2BP2*); *rs780094:A>G* (*GCKR*); *rs7901695:T>C* (*TCF7L2*) e *rs13266634:C>T* (*SLC30A8*, *R325W*), assim como as do segundo grupo *rs1801282:C>G* (*PPARG*); *rs7799039:A>G* (*LEP*); *rs1137100:A>G* (*LEPR*); *rs1137101:A>G* (*LEPR*); *rs8050136:A>C*, *rs1421085:T>C* e *rs9930506:A>G* (*FTO*) não foram associadas com o desenvolvimento do diabetes tipo 2 e/ou obesidade, assim como parâmetros laboratoriais em amostras de Euro-brasileiras.

Uma outra abordagem foi realizada com o objetivo de identificar variabilidades genéticas não descritas em nossa população no gene da preprorelina que dá origem a dois controladores antagônicos do metabolismo, os peptídeos grelina e obestatina, produtos do gene *GHRL*.

6.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE *GHRL* EM INDIVÍDUOS CTRL, ObT2DM E Ob

Conforme previamente abordado, o gene *GHRL* produz hormônios de ações antagônicas, grelina e obestatina. Quaisquer polimorfismos que afetem a estrutura, transcrição ou tradução deste gene podem comprometer a ação destes peptídeos e, conseqüentemente, o estímulo da fome, obesidade e o T2DM (PERRET; DE VRIESE; DELPORTE, 2014).

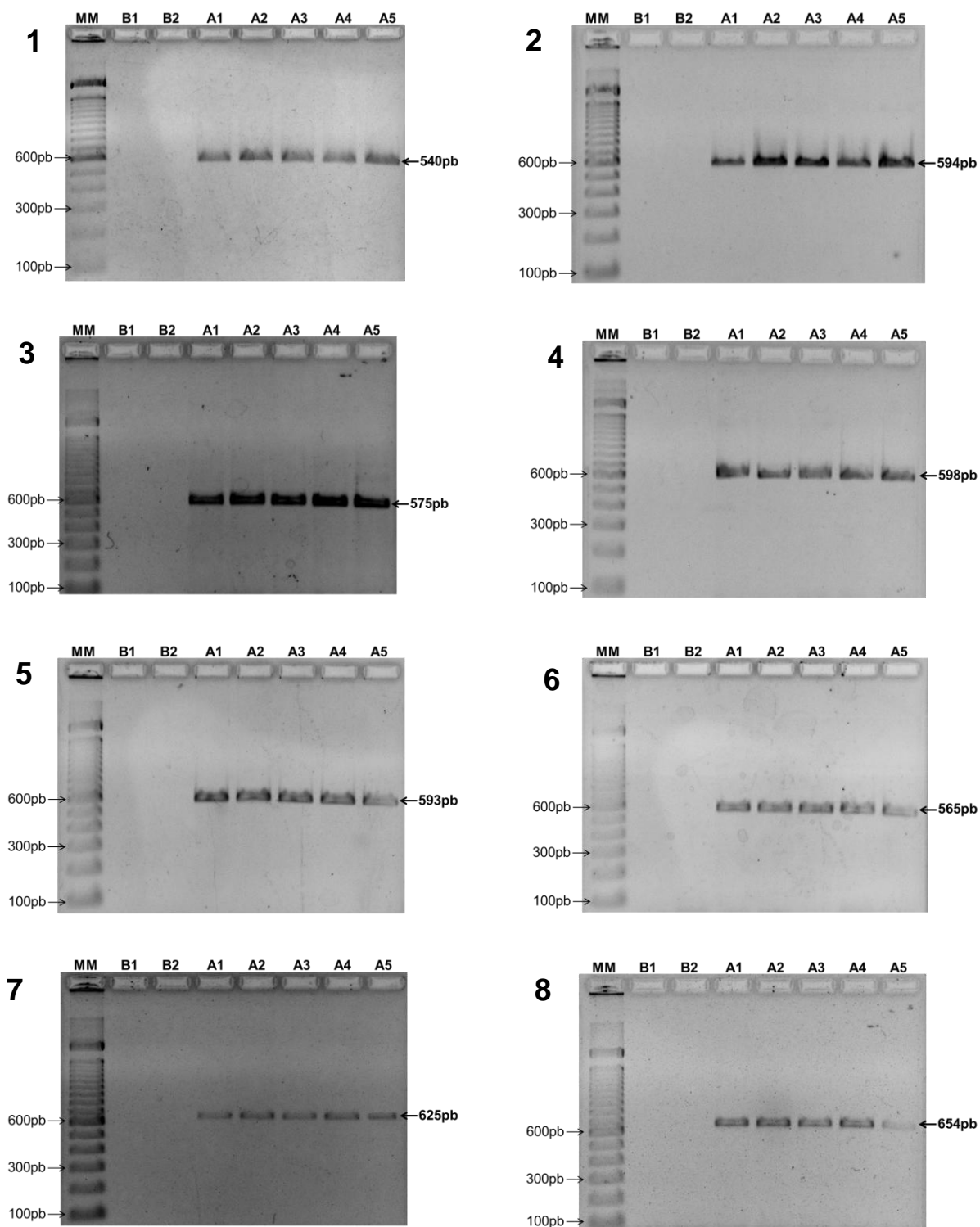
Como ainda não foi reportado o perfil de polimorfismos do gene *GHRL* na população brasileira, decidimos sequenciar este gene por completo para determinar se há alguma variação genética característica na população brasileira ou ainda em algum grupo específico de amostras. Sendo assim, a estratégia utilizada foi amplificar o gene inteiro por PCR e então realizar a reação de sequenciamento. Inicialmente, foram analisadas amostras de 5 indivíduos do grupo CTRL, 10 indivíduos do grupo ObT2DM e 5 do grupo Ob.

6.4.1 Reação em cadeia da Polimerase e Sequenciamento do gene *GHRL*

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, assim como as condições de ensaio de PCR constam nas Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente, em Material e Métodos (item 5). Resumidamente e conforme já mencionado, utilizando 19 pares de primer foram amplificadas 19 regiões que continham o gene *GHRL* inteiro e todas foram sequenciadas.

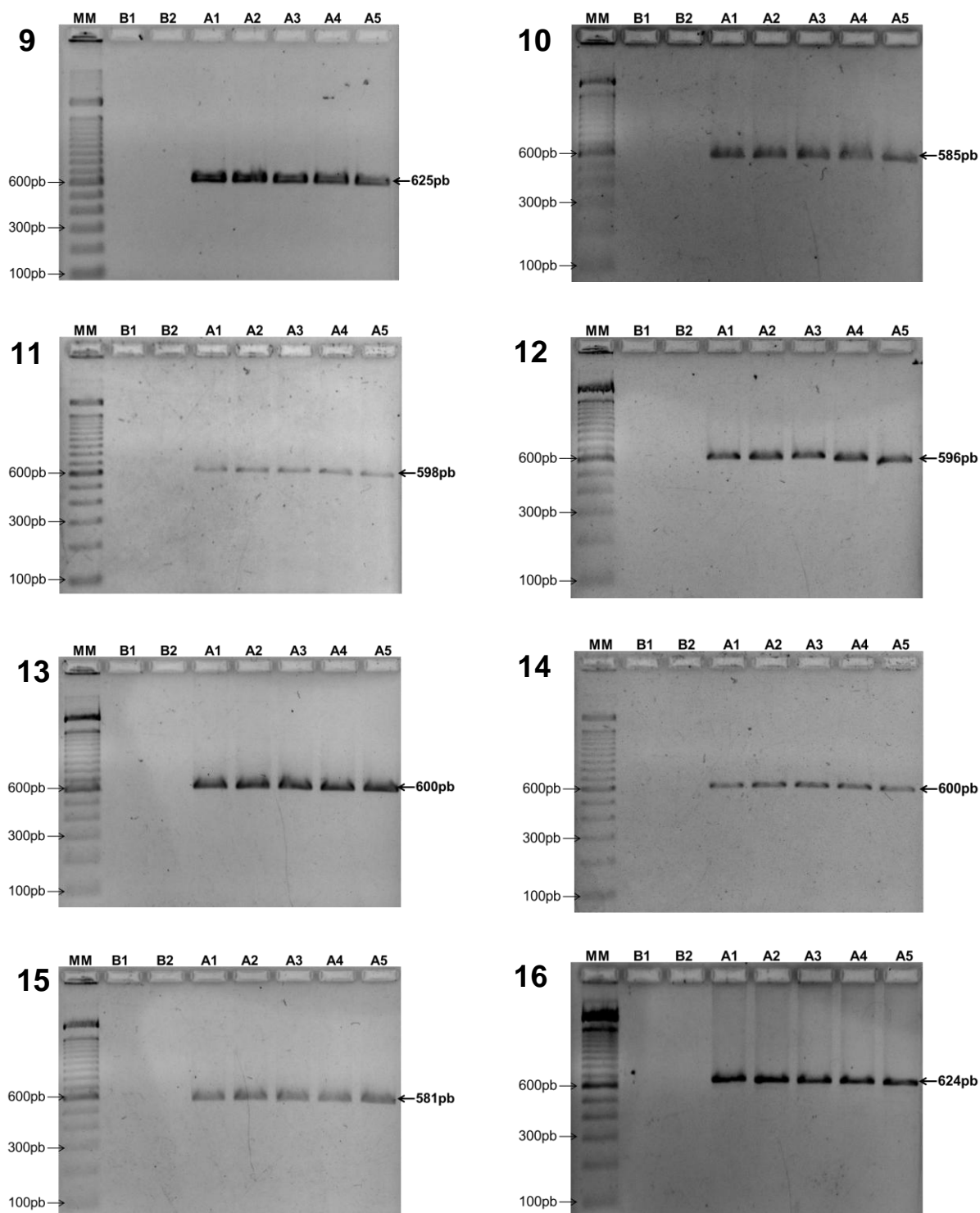
Os amplicons obtidos constam descritos nas Figuras 12, 13 e 14.

FIGURA 12 – PERFIS ELETROFORÉTICOS DO PRIMEIRO AO OITAVO AMPLICON DO GENE *GHRL*



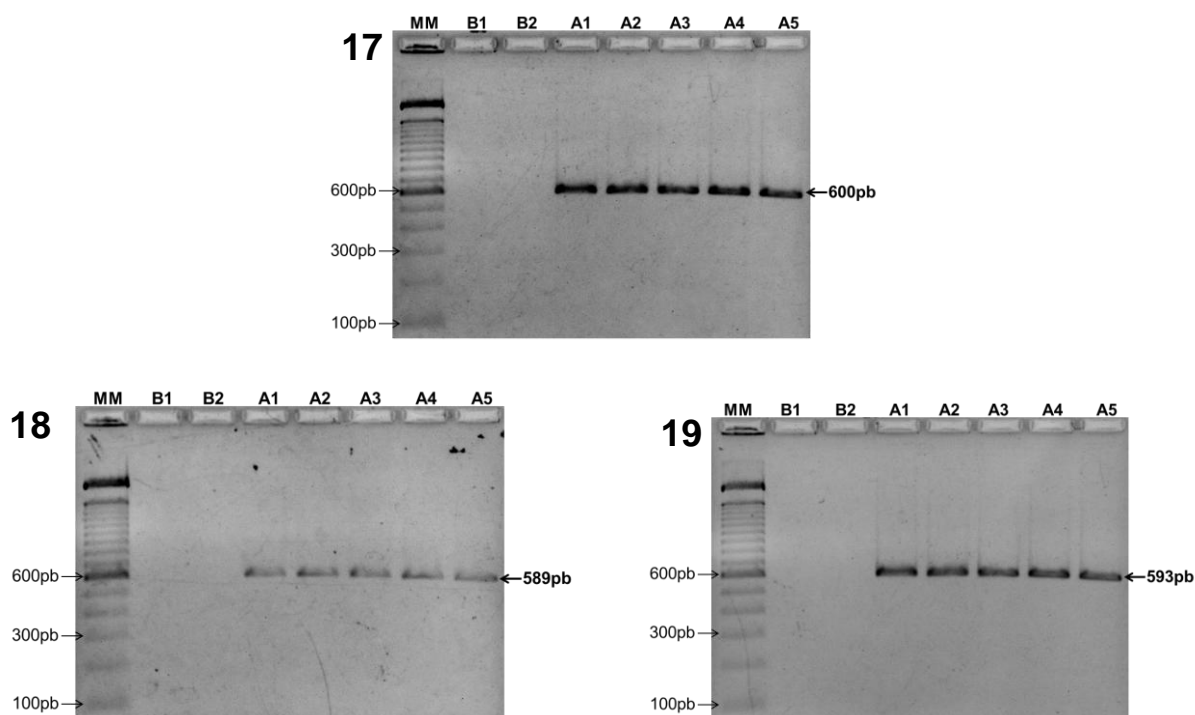
As fotografias (1 a 8) representam os perfis eletroforéticos dos amplicons (*GHRL A01* ao *GHRL A08*) do gene *GHRL*. Gel agarose a 2% (m/V). Tampão TBE 1X. MM, marcador de massa molecular; B1 e B2, controles negativos da reação; A1-A5, cinco amostras do respectivo amplicon.

FIGURA 13 – PERFIS ELETROFORÉTICOS DO NONO AO DÉCIMO SEXTO AMPLICON DO GENE *GHRL*



As fotografias (9 a 16) representam os perfis eletroforéticos dos amplicons (*GHRL A09* ao *GHRL A16*) do gene *GHRL*. Gel agarose a 2% (m/V). Tampão TBE 1X. MM, marcador de massa molecular; B1 e B2, controles negativos da reação; A1-A5, cinco amostras do respectivo amplicon.

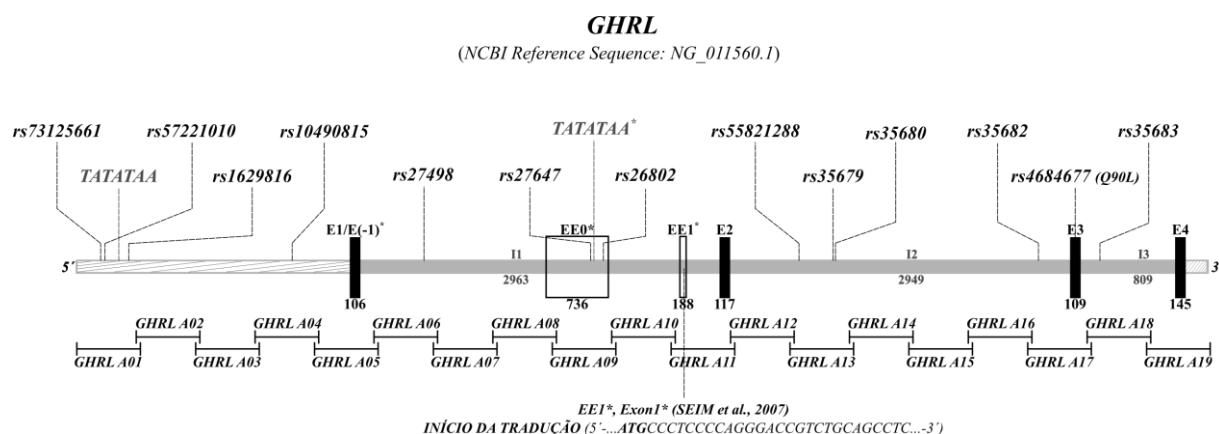
FIGURA 14 – PERFIS ELETROFORÉTICOS DO DÉCIMO SÉTIMO AO DÉCIMO NONO AMPLICON DO GENE *GHRL*



As fotografias (17 a 19) representam os perfis eletroforéticos dos amplicons (*GHRL* A17 ao *GHRL* A19) do gene *GHRL*. Gel agarose a 2% (m/V). Tampão TBE 1X. MM, marcador de massa molecular; B1 e B2, controles negativos da reação; A1-A5, cinco amostras do respectivo amplicon.

Conforme observado nas Figuras 12 a 14 todos os produtos foram amplificados satisfatoriamente.

Após esta etapa, foi realizado o sequenciamento de todos estes amplicons. 13 polimorfismos foram encontrados nas amostras dos grupos estudados. A Figura 15 apresenta em detalhes a posição das variações genéticas encontradas.

FIGURA 15 – VARIANTES IDENTIFICADAS NO GENE *GHRL*

5', região promotora. 3', UTR. Em cinza, íntrons. As caixas (retângulos) representam os éxons (pretos, NCBI; translúcidos, Seim e colaboradores (2007)). De *GHRL A01* a *GHRL A19*, os amplicons. TATATAA, sequência promotora encontrada pelo autor (sequência do NCBI). Regiões em “*”, todas descritas por Seim e colaboradores (2007).

*E(-1), Éxon -1 (menos 1). Apresenta a mesma sequência do Éxon 1 do NCBI e também é conhecido como Éxon -1b (106pb). Nele está contido o Éxon -1a.

*EE0, Éxon 0 (zero) estendido. Também conhecido como Exon 0b, possui 736pb. Localizado no íntron 1, quando analisado pela sequência depositada no NCBI. Nele também estão contidos: Éxon 0 (Éxon 0a), Éxon 0c, Éxon f e Éxon g.

*EE1, Éxon 1 (um) estendido. Também conhecido como Éxon 1b, possui 188pb. Localizado no íntron 1 quando analisado pela sequência depositada no NCBI. No EE1 está contido o Éxon 1. Neste pode ser encontrado o início da sequência de tradução da isoforma 1 da preprogrelina.

Cada variação genética foi representada pelo respectivo rs. Figura construída com base nas informações retiradas de NCBI Reference Sequence: NG_011560.1 e Seim e colaboradores (2007).

Das 13 variantes encontradas (Figura 15), 4 se localizam na região promotora, 3 no íntron 1, 4 no intron 2, 1 no éxon 3 e 1 no íntron 3, considerando a sequência NCBI Reference Sequence: NG_011560.1, referenciada a partir de agora apenas como NCBI.

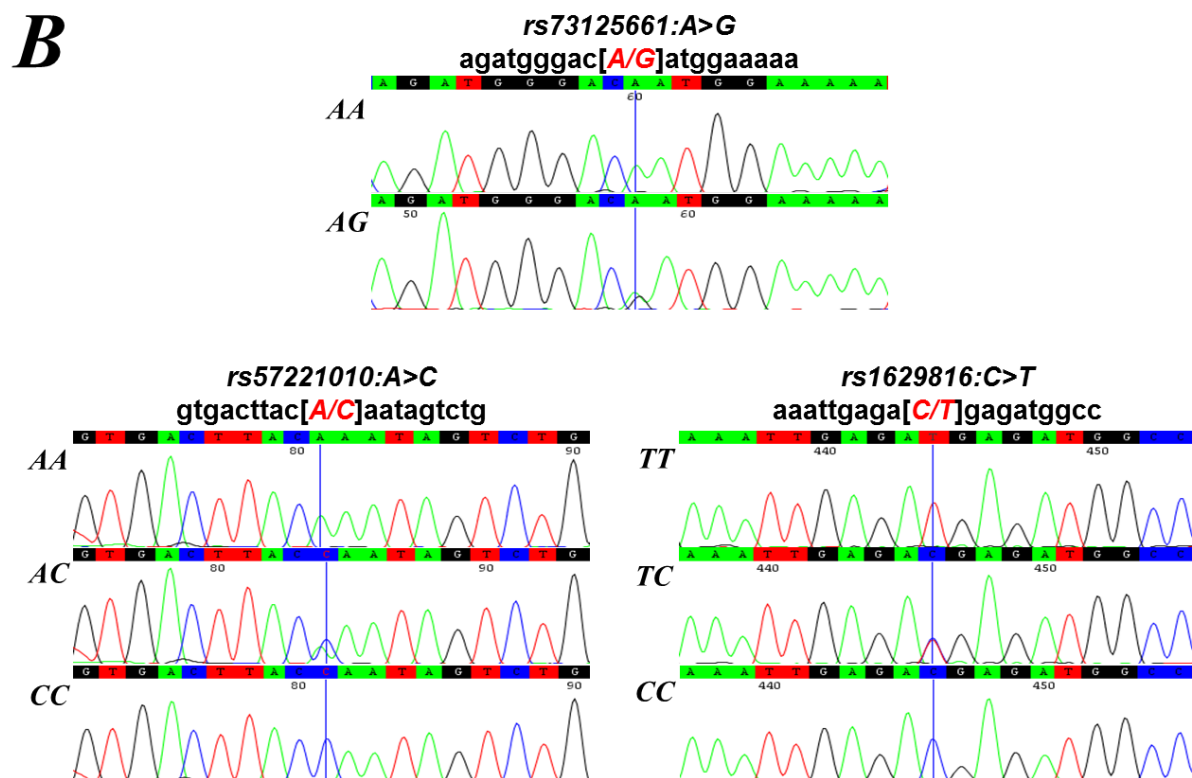
Cada variação genética será abordada, em maior quantidade de detalhes, em seu respectivo tópico.

6.4.2 Variantes do Amplicon 1 (*GHRL A01*) do gene *GHRL*

Este amplicon apresentou parte da sequência da região promotora (Figura 15). A Figura 16 mostra os 3 polimorfismos detectados.

FIGURA 16 – VARIANTES DO AMPLICON 1 DO GENE *GHRL*

A (5')...agctaataagccgacggtgaagacaaaatgataccattcaaaacccctctaaaagtgtatgacaagagaaaaggaagaac**agatggggacAatg**
gaaaaattg**gtgacttacAaatagtctg**gagattaacagtaatgtgctaacactgggttttaatttgataaatgtactacggt**TATATAA**gatattcacga
 gtgaaactgaattgggttattcagagagaaagatttcattccatgtttatatttctgctggaagcaagcattataatcaaaattacctgggatacttgtaattataatcaaaatta
 cctgagatactgaaacagattctaaagcccccacgccagagctactggatcagaatccaaggatggagtcctataaacgtgcataaaacttatgaagcttccctcatgaatccaaca
 caacccaacacaggtctgtatctgg**aaattgagaCgagatggcc**ctccaagccacgtccaccctgaggtcgtcct**atggctcttagcgggtccat...**(3')



A, sequência do amplicon gerado. Região dos primers (cinza, negrito e sublinhado 5' e 3'). Sequência mostrada no(s) eletroferograma(s) (preto e negrito). Variação genética (vermelho em caixa alta). Sequência promotora encontrada no presente estudo (em caixa alta, cinza, negrito e *itálico*). B, variação genética, sequência mostrada no(s) eletroferograma(s) e eletroferograma da reação de sequenciamento. Ordem de genótipos, mais frequente para o menos frequente.

Conforme já mencionado, os polimorfismos *rs73125661:A>G*, *rs57221010:A>C* e *rs1629816:C>T* foram detectados na região promotora. A variante *rs73125661:A>G*, caracterizada geneticamente como do tipo transição, não apresentou indivíduos homozigóticos para o alelo-G nas amostras dos grupos estudados.

Em contrapartida, os polimorfismos *rs57221010:A>C* (transversão) e *rs1629816:C>T* (transição) apresentaram os três genótipos.

Além disso, não foram encontradas informações na literatura, exceto seu número de identificação (*rs*), de quaisquer estudos avaliando esses polimorfismos com o diabetes tipo 2 e/ou obesidade.

Diferentemente deste amplicon, apenas uma variante foi encontrada tanto no Amplicon 4 (também ausente de um genótipo) e no Amplicon 6 (três genótipos).

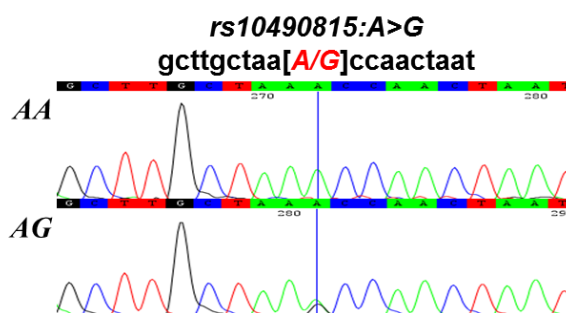
6.4.3 Variante do Amplicon 4 (GHRL A04) do gene GHRL

Este amplicon também apresentou parte da sequência da região promotora (Figura 15). A Figura 17 mostra o polimorfismo detectado.

FIGURA 17 – VARIANTE DO AMPLICON 4 DO GENE GHRL

A (5')...catatgctgttgacacttagactatagtaggtatcagcatagctttatattactgggaaccaacaaaattcgtgtgacttgcttcattgtggctgggaccaagcttaatg cctccaaggtatgctgtatattctattgcaaatgtgaatctcgaaattataaaagctacaactaggacaaaaagcaacccaccaaatagccctatatcaagaataaaatctctt ctagaaccaccagaatttgctcttcagactgaagtttagccaaatctatgaaaaaga**gcttgctaa****Accaactaat**tatcagtacaaaataattataatgaaaagtc tatgaagataattgttcagatgcccttcacatatagcaattaattcacaatgatgagtcactcatgtgcttcataaggcaggccctcaagagaccgcacagaaaggaaag ccaccgactggagagaacctgctcctgagcccccacaaagttccaaaaggacgaatggggcttcctcaccctcaaggagttgccaaactgggctggttattatca**cacttga** aaagaatgaggaagg...(3')

B



A, sequência do amplicon gerado. Região dos primers (cinza, negrito e sublinhado 5' e 3'). Sequência mostrada no eletroferograma (preto e negrito). Variação genética (vermelho em caixa alta). B, variação genética, sequência mostrada no eletroferograma e eletroferograma da reação de sequenciamento. Ordem de genótipos, mais frequente para o menos frequente.

Não foram encontradas informações de que o alelo-G da variante *rs10490815:A>G* tenha sido associado com o diabetes tipo 2. Porém, um único estudo foi encontrado associando este polimorfismo com a obesidade em um estudo investigando indivíduos portadores de câncer de mama (DOSSUS *et al.*, 2008). Neste estudo caso-controle foram investigadas 1.359 portadoras de câncer de mama e 2.389 saudáveis. Para avaliar a relação com a obesidade, os autores criaram um subgrupo para o parâmetro IMC (<25, 25-29 e >30). A relação do câncer de mama com a obesidade se dá pelo fato de que o ganho de massa corpórea esteja associado com um maior risco do desenvolvimento de câncer de mama pós-menopausa (KEY; VERKASALO; BANKS, 2001).

Segundo Dossus e colaboradores (2008), portadores do alelo-G do polimorfismo *rs10490815:A>G* apresentam um risco maior de desenvolver obesidade com uma razão de chance (OR) de 1,4 [95% IC: 1,0–2,1]. Embora esta associação tenha sido observada, ainda não foi descrito um mecanismo que explique sua relação com a obesidade. Sendo assim, mais estudos, em diferentes populações, deveriam ser realizados para avaliar o real efeito deste polimorfismo.

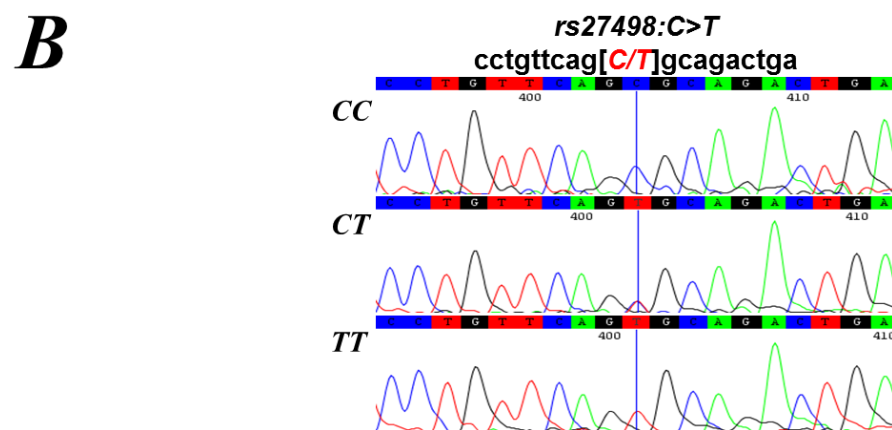
A próxima variante detectada não se localiza na região promotora.

6.4.4 Variante do Amplicon 6 (*GHRL A06*) do gene *GHRL*

Este amplicon apresentou parte da sequência do íntron 1 do gene *GHRL* (Figura 15). A Figura 18 mostra o polimorfismo detectado.

FIGURA 18 – VARIANTE DO AMPLICON 6 DO GENE *GHRL*

A (5')...gttgggtgctctgaaaaagcgcaagtcttctgaggactacagacctctctccacctctccacattcagcctctctgggtccagggccaaaagatgtctactcagggtg gcagacaggcctgtgaagacctctgtgacatgctcatatgttctgtggactaaagggtgggatttagccaccacagtgggtgtgtgagatgtttaccacaggaggtactttgtc cctcatgtccacttaaagattcagttccaaccggcctgtgcttctgtgtcccaagagactctagaagagctccaatcctccctgagggtgacttttaagtcagggtagggtggtcattcggc aatcaactgcttactgctcaatgtcctcctcactggacgtctcgtcccaattccat**cctgttcagCgcagactga**tttctggaacacaatgttcattatggagccaga tggcatatcagaaagagcactgtattaggagtcaagagatccatgggggaatccagcattgccctgatggctgtatagctttggggaaagtgaag...(3')



A, sequência do amplicon gerado. Região dos primers (cinza, negrito e sublinhado 5' e 3'). Sequência mostrada nos eletroferogramas (preto e negrito). Variação genética (vermelho em caixa alta).

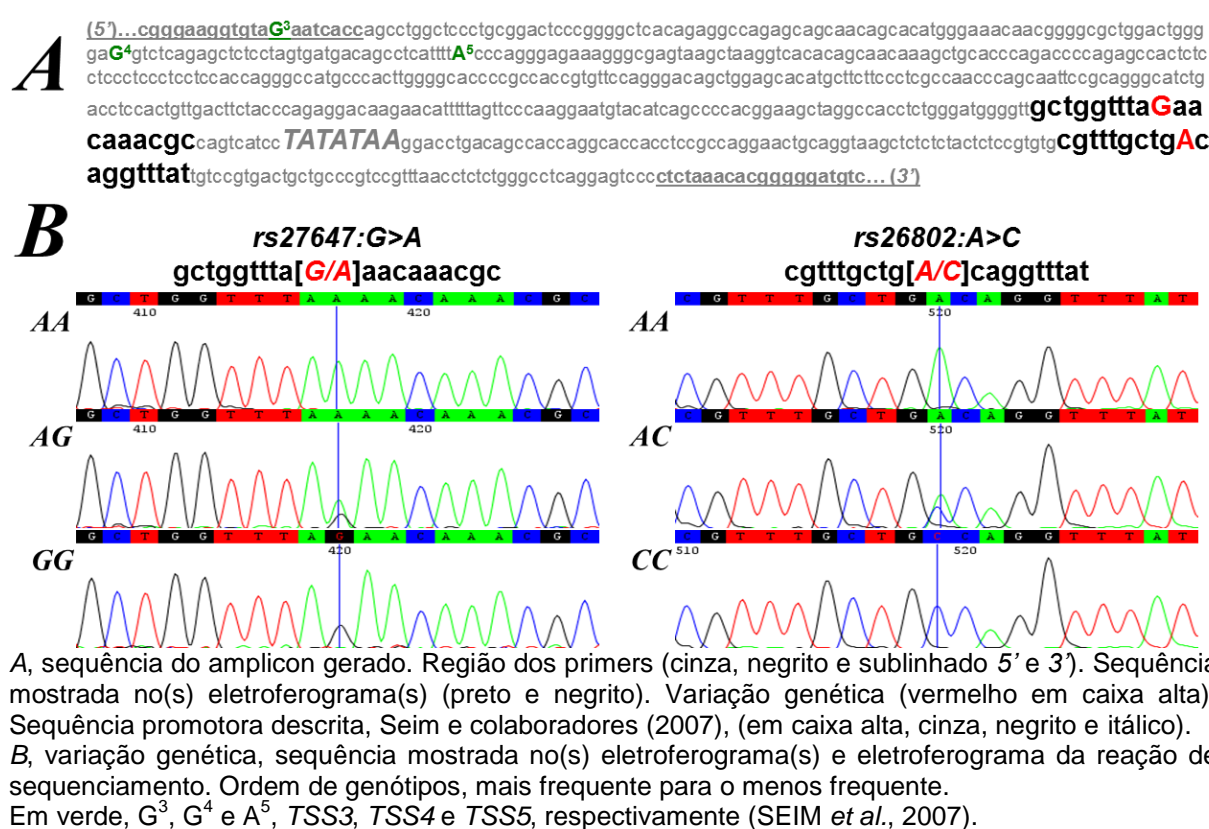
B, variação genética, sequência mostrada nos eletroferogramas e eletroferograma da reação de sequenciamento. Ordem de genótipos, mais frequente para o menos frequente.

Não foram encontrados estudos avaliando o efeito do alelo-*T* do polimorfismo *rs27498:C>T* com o T2DM e/ou obesidade. Dessa forma, concluímos que nosso estudo é o primeiro a apresentar esta informação.

6.4.5 Variantes do Amplicon 9 (GHRL A09) do gene GHRL

Duas variantes, *rs27647:G>A* e *rs26802:A>C*, foram encontradas neste amplicon (Figura 15). Estes polimorfismos foram detectados próximos a uma sequência promotora e a sítios de início de transcrição (*Transcription Start Sites*, *TSS*) descritos por Seim e colaboradores (2007). A Figura 19 mostra essas informações detalhadamente.

FIGURA 19 – VARIANTES DO AMPLICON 9 DO GENE GHRL



Ambos os polimorfismos encontrados neste amplicon, não alteram (*in silico*) a sequência *TATATAA* da região promotora (Figura 19). Além disso, estão localizados a 3' de sítios de início de transcrição. Também não foram encontradas informações de que a região que estas variantes se localizam seja de sinalização ou que possa, de alguma forma, comprometer o transcrito.

A variante *rs27647:G>A* está a 429pb do TSS3, 336pb do TSS4, 299pb do TSS5 e a 19pb a 5' da sequência promotora (critério de contagem, SNP ao 5'-T,

primeiro *T* da sequência *TATATAA*). A variante *rs26802:A>C*. Esta se encontra a 532pb do *TSS3*, 439pb do *TSS4* e 402pb do *TSS5* e a 84pb a 5' da sequência promotora. Entre os 2 SNPs há 102 nucleotídeos (Figura 19).

Estudando 1.275 indivíduos de origem europeia e portadores de obesidade, Gueorguiev e colaboradores (2009) observaram que o alelo-A da variante *rs27647:G>A* mostrou não estar associada com a obesidade e também com a concentração plasmática de glucose nos indivíduos estudados. Em contrapartida, este foi associado ($P=0,009$) com os níveis de insulina após teste oral de tolerância à glucose realizado em obesos. Os autores mencionam que embora ela não esteja diretamente associada à obesidade, esta variante pode contribuir para a resistência da insulina especialmente nos casos de obesidade de início precoce. Os pesquisadores alertam também para a necessidade de mais estudos que tentem elucidar o mecanismo molecular desse efeito, já que ainda não é conhecido. Avaliando o IMC, Chung e colaboradores (2009) não encontraram associação do alelo-A da variante *rs27647:G>A* com o IMC em seu estudo, embora tenham citado estudos que mostraram este alelo associado com o aumento da adiposidade em crianças e adultos japoneses, italianos e norte americanos.

Na busca de determinar uma relação entre percentual de gordura corporal, percentual de gordura do tronco, parte inferior do corpo (pernas), porcentagem de gordura e lipídeos séricos, Martin e colaboradores (2008) avaliaram, dentre outros polimorfismos, o *rs26802:A>C* em 1.464 canadenses. Tanto o alelo dominante quanto menor deste e dos demais polimorfismos investigados não mostraram associações significativas com quaisquer alterações na composição corporal ou com a concentração sérica de lipídeos em magros ou obesos.

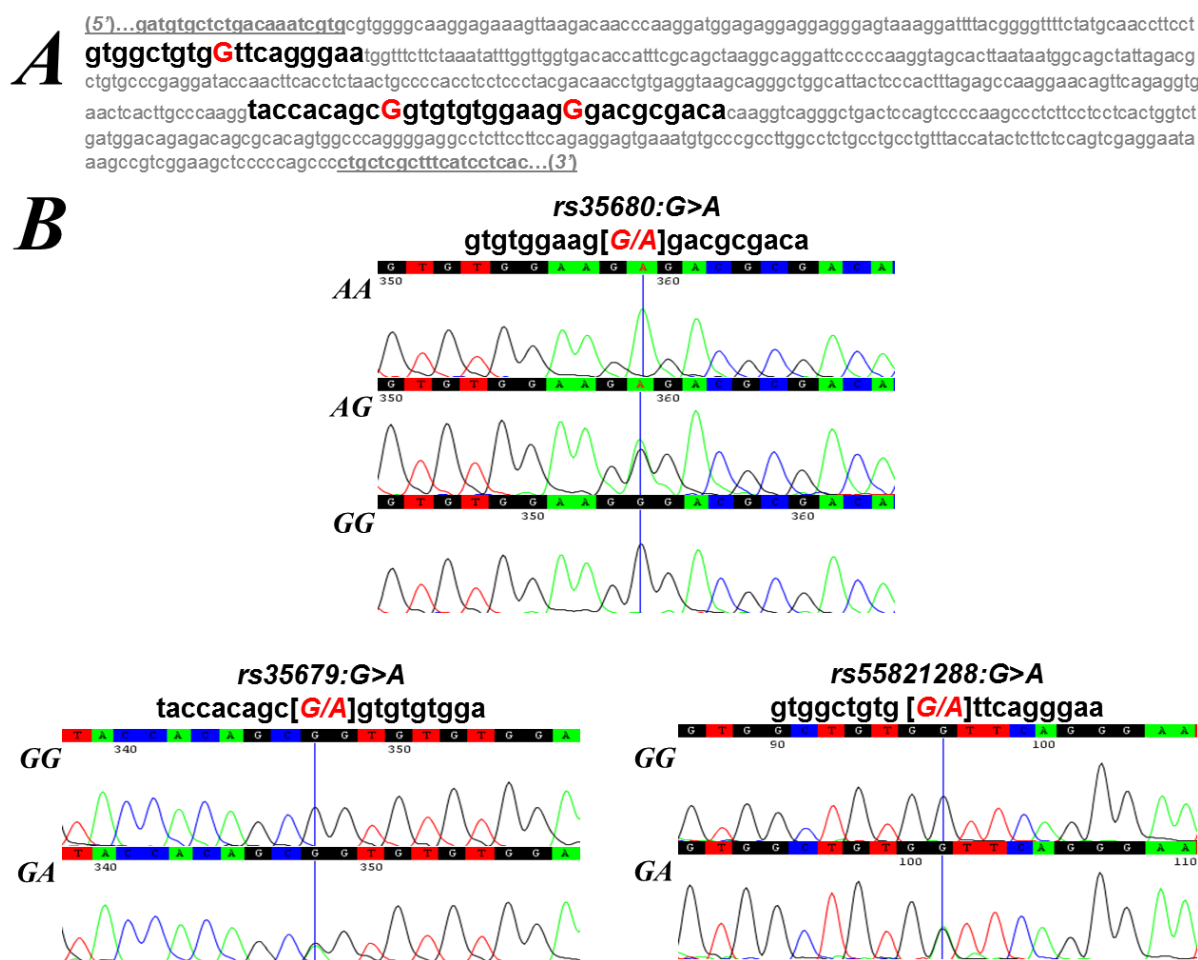
Quanto à associação destes polimorfismos com o diabetes tipo 2, não foram encontrados estudos que avaliaram o efeito destas variantes com o foco exclusivo nesta patologia. De forma semelhante, também não foram encontradas mais informações que associassem essas variantes com a obesidade.

6.4.6 Variantes do Amplicon 13 (*GHRL A13*) do gene *GHRL*

Neste amplicon foram encontradas 3 variantes localizadas no íntron 2 do gene *GHRL* (Figura 15). Ambas as variações genéticas *rs55821288:G>A* e *rs35679:G>A* não apresentaram indivíduos homozigotos para o alelo-A, enquanto

que a *rs35680:G>A* mostrou os três genótipos. Acreditamos que a não identificação de genótipos homozigotos para as variantes *rs55821288:G>A* e *rs35679:G>A* esteja relacionada à frequência do alelo menor de ambas, somado o efeito do nosso número amostral. A Figura 20 mostra os 3 polimorfismos detectados.

FIGURA 20 – VARIANTES DO AMPLICON 13 DO GENE *GHRL*



A, sequência do amplicon gerado. Região dos primers (cinza, negrito e sublinhado 5' e 3'). Sequência mostrada nos eletroferogramas (preto e negrito). Variação genética (vermelho em caixa alta).

B, variação genética, sequência mostrada nos eletroferogramas e eletroferograma da reação de sequenciamento. Ordem de genótipos, mais frequente para o menos frequente.

As três variantes são do tipo transição. O polimorfismo *rs55821288:G>A* está a 246pb à 5' da variante *rs35679:G>A*. Esta se localiza à 5' da *rs35680:G>A* e apenas 11 nucleotídeos separam uma da outra (Figura 20).

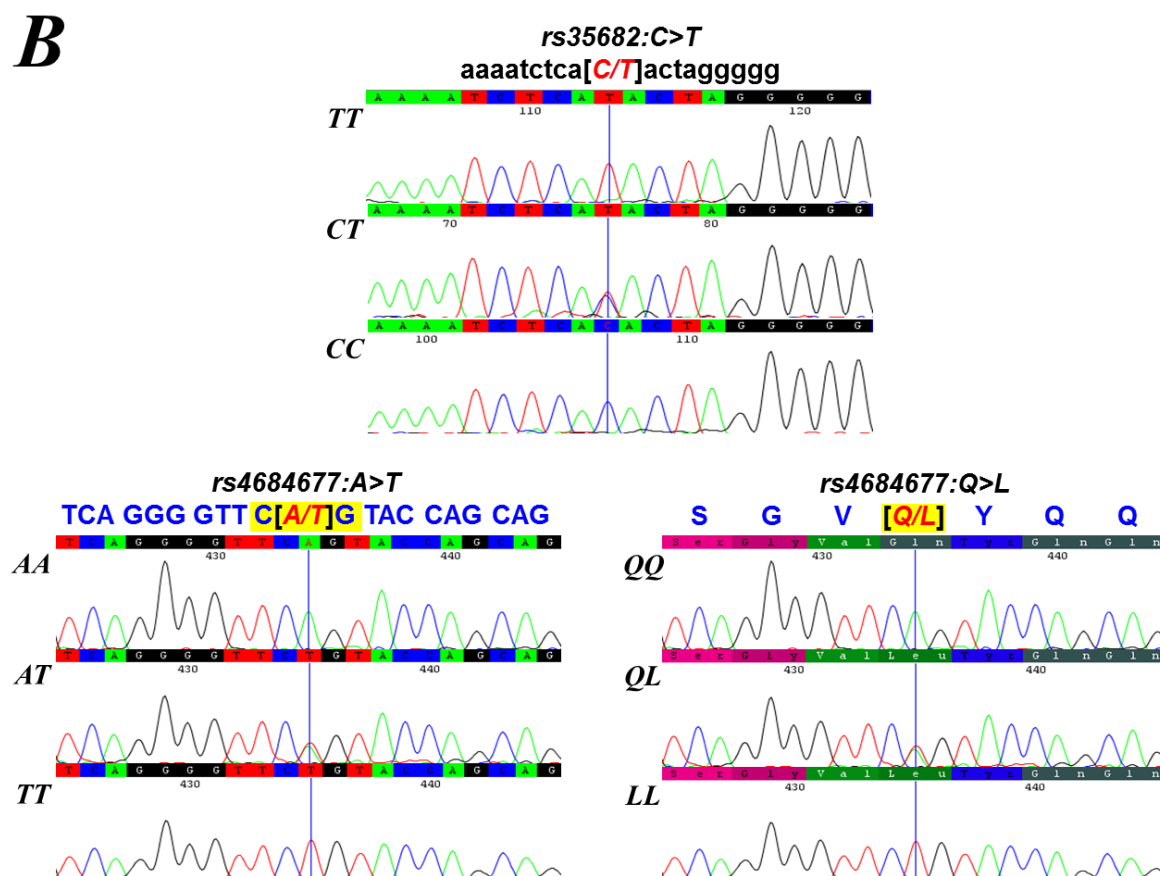
Não foram encontradas informações destes três polimorfismos com o diabetes tipo 2 e/ou obesidade, sendo este o primeiro trabalho a apresentar uma informação conjunta destas variantes nas patologias estudadas.

6.4.7 Variantes do Amplicon 17 (GHRL A17) do gene GHRL

Neste amplicon foram encontradas 2 variantes. Enquanto a primeira (rs35682:C>T) foi detectada no final do íntron 2, a segunda (rs4684677:A>T, Q90L) corresponde ao nucleotídeo 44 dos 109 que pertencem ao éxon 3 do gene *GHRL* (Figura 15). Além disso, a variante Q90L está à 329pb à 3' da rs35682:C>T. A Figura 21 mostra os dois polimorfismos encontrados.

FIGURA 21 – VARIANTES DO AMPLICON 17 DO GENE *GHRL*

A (5')...aagggaatagaagccagcagggccagtgctgagaatgctgggcagacccccctgccagggcctgaaatgctgccattgggtgactcaaccctttgtctcaaaactgcaagg gagaaaa**aaaatctca****C**actaggggggaccacagcctttatcagcaatccattagaggctaaggctgagaggcatgagagtgaaggtaagtgtctgaaagatg gtgagtgggaaggtagctgtggtcctgagaaaggaagagaacctggctgagggtgactcagcagtcctgctggggcccaaggccattctccctccactcctgaagagagg cagagagcccagagcccccttgagatggggatgggcatgacctgtgacatctctgggtcctccctgacctgacctctag**TTCAACGCCCCCTTTGATGTTGGAAT** **CAAGCTGTCAGGGGTTCA****G****TACCAGCAG**CACAGCCAGGCCCTGGGGAAGTTTCTTCAGGACATCCTCTGGG AAGAGGCCAAAGgtgagtctgacctggactgggttctgctggtttctctgagcccccacatgggagttcact**ctgtgaggatgagtttcc...**(3')



A, sequência do amplicon gerado. Região dos primers (cinza, negro e sublinhado 5' e 3'). Azul e caixa alta, éxon 3 do gene *GHRL* (NCBI). Sequência mostrada nos eletroferogramas (preto e negrito ou azul, caixa alta e em negrito). Variação genética (vermelho em caixa alta). Destaque em amarelo para o códon que possui a variante Q90L.

B, variação genética, sequência mostrada nos eletroferogramas (representação por nucleotídeos, bases ou aminoácidos, 1 letra) e eletroferograma da reação de sequenciamento (representação por nucleotídeos, bases ou aminoácidos, 3 letras). Ordem de genótipos, do mais para o menos frequente.

Chung e colaboradores (2009) estudaram 335 variações genéticas em 30 genes candidatos para a obesidade em americanos de origem europeia. Dentre as variações estudadas, o alelo-*T* da variante *rs35682:C>T* foi associado ($P<0,001$) com o índice de massa corpórea dos investigados. Os autores mencionam que esta variação não está localizada em regiões conservadas entre as espécies, não se encontra em sítios de *splicing* e também não afetam a expressão. Além disso, não sabem o mecanismo de como ela exerce este efeito sobre o IMC, mas sugerem que possa ser decorrente de outra variante em desequilíbrio de ligação com ela. Este foi o único estudo encontrado que apresenta informações desta variação genética.

Dessa forma, nosso estudo é o primeiro a apresentar informações desta variação genética com o *Diabetes mellitus* tipo 2.

A variação genética *rs4684677:A>T* (*Q90L*, *Gln90L*, *Glutamina90Leucina*) está localizada na posição 90 dos 117 aminoácidos que constituem a isoforma 1 (a maior) da preprogrelina. Considerando apenas os 23 aminoácidos que constituem a obestatina, o *Q90* do peptídeo completo corresponde ao de número 15. A glutamina desta posição fica entre uma valina (V) e uma tirosina (Y) conforme pode ser observado na Figura 21.

No estudo de Gueorguiev e colaboradores (2009), o alelo-*A* do polimorfismo *rs4684677:A>T* mostrou associação ($P=0,009$) com a obesidade após os valores de IMC terem sido ajustados (por idade e sexo) em famílias obesas. Portadores do alelo-*A* desta variante apresentaram maior valor de IMC. Porém, segundo estes autores após realizarem outros testes aplicando correções, essa associação significativa não se manteve. Além disso, embora considerem que polimorfismos no gene *GHRL* possam alterar o peso corporal, comportamento alimentar e a resistência à insulina, os autores mencionam que esta variação genética não é a que mais contribui para este efeito.

Este polimorfismo também foi testado em brasileiras portadoras de diabetes gestacional em um estudo do tipo caso-controle. A variante *Q90L* também não se mostrou associada com esta forma de diabetes (ROCHA *et al.*, 2014).

A substituição de um aminoácido por outro pode modificar a atividade biológica de peptídeos (LI, Y. *et al.*, 2006; MEJIAS *et al.*, 2011). Uma hipótese que busca explicar como a variante *Q90L* exerce seu efeito foi elaborada após testes em camundongos. Nestes foi demonstrado que a obestatina que continha o *90L* (leucina na posição 90) apresentou um efeito maior em inibir a atividade neuronal em sítios-

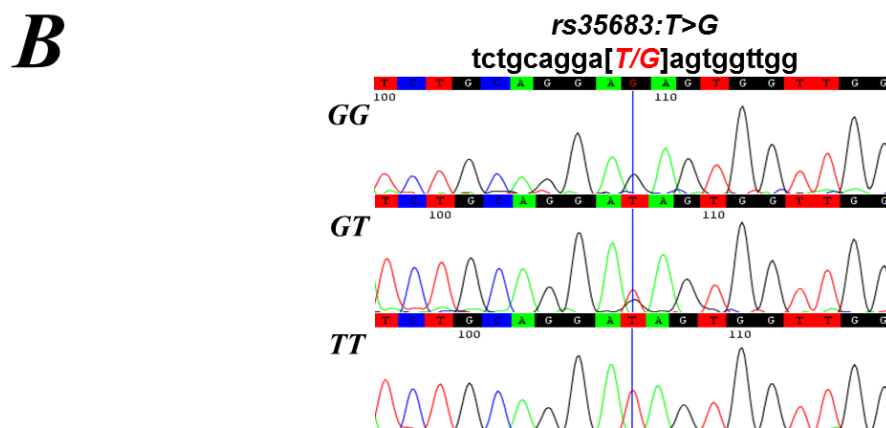
alvo que controlam o estímulo alimentar ou a secreção de hormônio do crescimento quando comparada à obestatina portadora de glutamina (HASSOUNA *et al.*, 2012). Com base nisso, parece ser aceitável a justificativa de que o alelo-*T* (90L) deste polimorfismo tenha sido encontrado com maior frequência em mulheres com menor IMC ou anoréxicas (DARDENNES *et al.*, 2007).

6.4.8 Variante do Amplicon 18 (GHRL A18) do gene GHRL

Uma única variação genética foi encontrada no Amplicon 18 do gene *GHRL*. Este amplicon continha parte da sequência do íntron 3 do gene *GHRL* (Figura 15). A Figura 22 mostra o polimorfismo identificado.

FIGURA 22 – VARIANTE DO AMPLICON 18 DO GENE *GHRL*

A (5')...ctgcctggactgggttgcctcggttctctgcagcccccacatgggagttcactctgtgggtgatgagtttcccaacctctgctctccaaaagaacttctaatttcccttcccaa
aga**tctgcaggaT**agtgggttgctagtattgtgagtggtcagaaggaggtcatcatagctttgtgttcaagaatgttctaagaactagtagcattaactagcttgggg
cctcagttgaacctcagcttcttaactgtaaaatggagctatttaccattgtgagagttcacaattattgggttacaccgtctcactgcgtaacttactccacaaacaaaaggaatt
ggtgccaaaatagcactcagaacaggttctgcagcctgttaagcagttcctcaaatattagagcttcctgagttaagcaagggttgccttgaatccctcacttgtaaaagaaaa
aaagaaaccgcccaactgattgaggtggcagaacacctgcacatctgcaaaagcactgtctcaccaggcggtgacctgcacccctgggga**acagcagggtagcattca**
c...(3')



A, sequência do amplicon gerado. Região dos primers (cinza, negrito e sublinhado 5' e 3'). Sequência mostrada nos eletroferogramas (preto e negrito). Variação genética (vermelho em caixa alta).

B, variação genética, sequência mostrada nos eletroferogramas e eletroferograma da reação de sequenciamento. Ordem de genótipos, mais frequente para o menos frequente.

Chung e colaboradores (2009) também estudaram a variação genética *rs35683:C>T*. O alelo-*T* desta variante também foi associado ($P<0,001$) com o índice de massa corpórea. Estes autores também descrevem que a variação genética *rs35683:C>T* (Figura 22) está em desequilíbrio de ligação com a variante

rs35682:C>T (Amplicon 17, Figura 21), mesmo uma estando a 600pb de distância da outra. Diante disso, decidimos analisar esta região da sequência do gene *GHRL* que continha ambos os polimorfismos e observamos, *in silico*, que a distância mencionada pelos autores (600pb), é na realidade de 532pb com base na sequência obtida do NCBI.

Outro estudo reforça que ambas as variantes estão altamente correlacionadas ($r^2 = 0,96$, $P < 0,0001$), demonstrando um elevado nível de desequilíbrio de ligação entre elas (LI, P. *et al.*, 2014). Segundo esses autores, devido ao valor de r^2 qualquer uma pode ser considerada substituta da outra em uma regressão múltipla. Porém, quando os autores usaram o método BhGLM (*Bayesian hierarchical generalized linear models*, (YI, N.; BANERJEE, 2009; HUANG; XU; CAI, 2013)) para medir a força do alelo-*T* de ambas as variantes para se saber qual dos alelos/variantes apresenta (de fato) efeito no IMC, apenas o do polimorfismo *rs35683:C>T* pareceu ser o real responsável pelo efeito no IMC.

Esta foi a única informação encontrada na literatura mostrando a associação da variante *rs35683:C>T* com o IMC. Não foram encontradas informações deste polimorfismo com o diabetes tipo 2.

6.4.9 Frequências genotípicas e alélicas das variantes do gene *GHRL*

As Tabelas 21 e 22 apresentam as frequências dessas mesmas variantes encontradas no gene *GHRL* por grupos investigados.

TABELA 21 – FREQUÊNCIAS DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS AMPLICONS 1 AO 9 DO GENE *GHRL* POR GRUPO ESTUDADO

AMPLICON VARIANTE	CTRL (n=5)	ObT2DM (n=10)	Ob (n=5)	TOTAL (n=20)
AMPLICON 1				
rs73125661:A>G				
A/A	4/5	8/10	5/5	17/20
A/G	1/5	2/10	0/5	3/20
G/G	0/5	0/10	0/5	0/20
FAM (G) [95% IC]				7,5 [1-16]
rs57221010:A>C				
A/A	3/5	6/10	1/5	10/20
A/C	1/5	4/10	3/5	8/20
C/C	1/5	0/10	1/5	2/20
FAM (C) [95% IC]				30,0 [16-44]
rs1629816:C>T				
T/T	1/5	2/10	3/5	6/20
C/T	3/5	7/10	1/5	11/20
C/C	1/5	1/10	1/5	3/20
FAM (C) [95% IC]				42,5 [27-58]
AMPLICON 4				
rs10490815:A>G				
A/A	1/5	2/10	2/5	5/20
A/G	4/5	8/10	3/5	15/20
G/G	0/5	0/10	0/5	0/20
FAM (G) [95% IC]				37,5 [22-53]
AMPLICON 6				
rs27498:C>T				
C/C	2/5	3/10	2/5	7/20
C/T	2/5	5/10	1/5	8/20
T/T	1/5	2/10	2/5	5/20
FAM (T) [95% IC]				45,0 [30-60]
AMPLICON 9				
rs27647:G>A				
A/A	2/5	5/10	3/5	10/20
G/A	2/5	5/10	1/5	8/20
G/G	1/5	0/10	1/5	2/20
FAM (G) [95% IC]				30,0 [16-44]
rs26802:A>C				
A/A	3/5	5/10	3/5	11/20
A/C	2/5	3/10	2/5	7/20
C/C	0/5	2/10	0/5	2/20
FAM (C) [95% IC]				27,5 [14-41]

CTRL, indivíduos saudáveis; ObT2DM, diabéticas tipo 2 obesas; Ob, Obesas sem diabetes tipo 2. FAM, frequência do alelo menor.

A variante *rs10490815:A>G* (Tabela 21, Amplicon 4) não se mostrou no equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, provavelmente devido ao número amostral.

TABELA 22 – FREQUÊNCIAS DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS AMPLICONS 10 AO 19 DO GENE *GHRL* POR GRUPO ESTUDADO

AMPLICON VARIANTE	CTRL (n=5)	ObT2DM (n=10)	Ob (n=5)	TOTAL (n=20)
AMPLICON 13				
rs55821288:G>A				
G/G	4/5	4/10	2/5	10/20
G/A	1/5	6/10	3/5	10/20
A/A	0/5	0/10	0/5	0/20
FAM (A) [95% IC]				25,0 [12-38]
rs35679:G>A				
G/G	3/5	6/10	4/5	13/20
G/A	2/5	4/10	1/5	7/20
A/A	0/5	0/10	0/5	0/20
FAM (A) [95% IC]				17,5 [6-29]
rs35680:G>A				
A/A	1/5	3/10	2/5	6/20
G/A	2/5	6/10	2/5	10/20
G/G	2/5	1/10	1/5	4/20
FAM (G) [95% IC]				45,0 [30-60]
AMPLICON 17				
rs35682:C>T				
T/T	2/5	4/10	1/5	7/20
C/T	1/5	5/10	3/5	9/20
C/C	2/5	1/10	1/5	4/20
FAM (C) [95% IC]				42,5 [27-58]
rs4684677:A>T (Q90L)				
A/A	3/5	7/10	3/5	13/20
A/T	1/5	2/10	2/5	5/20
T/T	1/5	1/10	0/5	2/20
FAM (T) [95% IC]				22,5 [10-35]
AMPLICON 18				
rs35683:T>G				
G/G	2/5	4/10	4/5	10/20
T/G	2/5	4/10	1/5	7/20
T/T	1/5	2/10	0/5	3/20
FAM (T) [95% IC]				32,5 [18-47]

CTRL, indivíduos saudáveis; ObT2DM, diabéticas tipo 2 obesas; Ob, Obesas sem diabetes tipo 2. FAM, frequência do alelo menor.

Todas as variantes apresentadas nesta Tabela 22 estiveram no equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. A Tabela 23 mostra a comparação entre a frequência total do alelo menor de cada polimorfismo com outras populações.

TABELA 23 – COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS DO ALELO MENOR DAS VARIANTES DO GENE *GHRL* COM OUTRAS POPULAÇÕES.

VARIANTE (ALELO MENOR)	POPULAÇÃO	FAM [95% CI]	ESTUDO
<i>rs1629816:C/T (C)</i> (Amplicon 01)	Euro-Brasileiras	42,5 [27-58]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	56,6 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	2,2 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	59,5 [ND]	HapMap
<i>rs10490815:A/G (G)</i> (Amplicon 04)	Euro-Brasileiras	37,5 [22-53]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	31,4 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	61,9 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	28,6 [ND]	HapMap
<i>rs27498:C/T (T)</i> (Amplicon 06)	Euro-Brasileiras	45,0 [30-60]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	47,7 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	96,7 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	40,5 [ND]	HapMap
<i>rs27647:G/A (G)</i> (Amplicon 09)	Euro-Brasileiras	30,0 [16-44]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	34,1 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	10,2 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	24,8 [ND]	HapMap
<i>rs26802:A/C (C)</i> (Amplicon 09)	Euro-Brasileiras	27,5 [14-41]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	36,7 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	6,6 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	31,6 [ND]	HapMap
<i>rs35679:G/A (A)</i> (Amplicon 13)	Euro-Brasileiras	17,5 [6-29]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	25,4 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	0,0 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	0,0 [ND]	HapMap
<i>rs35680:G/A (G)</i> (Amplicon 13)	Euro-Brasileiras	45,0 [30-60]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	43,8 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	2,2 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	34,1 [ND]	HapMap
<i>rs35682:C/T (C)</i> (Amplicon 17)	Euro-Brasileiras	42,5 [27-58]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	45,3 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	2,3 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	38,8 [ND]	HapMap
<i>rs4684677:A/T (Q90L) (T)</i> (Amplicon 17)	Euro-Brasileiras	22,5 [10-35]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	10,8 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	1,1 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	0,0 [ND]	HapMap
<i>rs35683:T/G (G)</i> (Amplicon 18)	Euro-Brasileiras	32,5 [18-47]	Este estudo
	Caucasianos de origem europeia	54,4 [ND]	HapMap
	Asiáticos do Japão	98,7 [ND]	HapMap
	Nigerianos Yoruban	65,6 [ND]	HapMap

FAM, frequência do alelo menor (%). ND, não disponível.

O polimorfismo menos frequente encontrado, *rs73125661:A>G* (Tabela 21, Amplicon 1 do gene *GHRL*), apresentou uma frequência do alelo-G de 7,5%. Ao que parece, polimorfismos de menor frequência não puderam ser identificados com este tamanho amostral. Essa também pode ser uma justificativa do motivo pelo qual algumas variantes não apresentaram os 3 genótipos.

Outros estudos com um número expressivamente maior de indivíduos obteriam resultados mais amplos. Vale ressaltar também que a frequência e a identificação de um polimorfismo podem variar de acordo com o critério de seleção das amostras, assim como fatores étnicos.

As frequências do alelo menor dos polimorfismos *rs73125661:A>G* (Amplicon 1, *GHRL*), *rs57221010:A>G* (Amplicon 1, *GHRL*) e *rs55821288:A>G* (Amplicon 13, *GHRL*) não constam na Tabela 23 por não terem sido encontradas descritas. Dessa forma, acreditamos que este estudo é o primeiro estudo prospectivo mostrando estas variantes em uma população Euro-brasileira com herança europeia.

Por fim, nosso estudo mostrou que as variações genéticas encontradas no gene *GHRL* já foram catalogadas nas bases de dados (*dBSNP*) e nenhuma variação genética não catalogada foi identificada. Em contra partida, este foi o primeiro trabalho a sequenciar o gene inteiro da preprogrelina em uma população de Euro-brasileiras saudáveis e portadoras de diabetes tipo 2 e/ou obesidade.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos estudos realizados propomos novas linhas de pesquisa na temática em estudo, com potencial para ampliar o escopo do trabalho e mesmo consolidar resultados obtidos.

Análises de Desequilíbrio de ligação (LD) e Haplótipos

O efeito de polimorfismos no diabetes e obesidade, eventualmente, pode ser melhor materializado com as análises de LD e haplótipos. A análise de LD permite identificar polimorfismos que tenham efeitos associados e haplótipos destes, podem permitir uma maior força de identificação de marcadores associados ao diabetes.

Estudo da expressão gênica *in vitro*

Através da expressão dos genes em estudo, vinculados aos polimorfismos, seria possível identificar a funcionalidade destas variantes.

Estudo da expressão gênica *in vivo*.

Variantes do gene *GHRL*, como exemplo, poderiam ser avaliados quanto ao seu efeito quantificando a expressão desta proteína em estudos controlados em células imortalizadas.

Sequenciamento em plataformas de alta produtividade

O ressequenciamento de genes associados ao diabetes e obesidade é de interesse. Propomos, utilizando plataformas de alta produtividade como *MiSeq* (Illumina), *Ion Torrent* (Applied) e *Solid* (Applied), genes como os estudados nesta tese, poderiam ser completamente sequenciados em múltiplos indivíduos.

Análises de Bioinformática

Algoritmos de Bioinformática poderiam ser desenvolvidos para análises combinadas de todos os elementos em estudo como dados antropométricos, laboratoriais e genéticos. Além disso, é possível que estas ferramentas tenham poder para identificar combinações de elementos que permitam melhor identificação do processo patológico investigado.

7 CONCLUSÃO

- Os polimorfismos nos genes *PPAR γ* (*rs1801282:C>G*), *IGF2BP2* (*rs4402960:G>T*), *GCK* (*rs144723656:C>T* (Y215Y), *rs2268574:T>C*, *rs2268575:A>G*), *GCKR* (*rs780094:A>G*), *TCF7L2* (*rs7901695:T>C*), *LEP* (*rs7799039:A>G*), *LEPR* (*rs1137100:A>G* (*LEPR*), *rs1137101:A>G*), *SLC30A8* (*rs13266634:C>T*, R325W) e *FTO* (*rs8050136:A>C*, *rs1421085:T>C*, *rs9930506:A>G*) não foram associados à obesidade na presença ou ausência do diabetes tipo 2 em mulheres na amostra em estudo;
- O sequenciamento do gene da preprorelina permitiu identificar 13 variações genéticas (*rs73125661:A>G*, *rs57221010:A>C*, *rs1629816:C>T*, *rs10490815:A>G*, *rs27498:C>T*, *rs27647:G>A*, *rs26802:A>C*, *rs35679:G>A*, *rs35680:G>A*, *rs55821288:G>A*, *rs35682:C>T*, *rs4684677:A>T* (Q90L), *rs35683:C>T*) sem caracterizar marcadores para o diabetes tipo 2 ou obesidade;
- O polimorfismo *rs2268574:T>C* do gene *GCK*, localizado em sequência facilitadora do processo de *splicing*, foi associado com o *Diabetes mellitus* gestacional, embora não tenha sido associado em mulheres obesas na presença ou ausência do *Diabetes mellitus* tipo 2 na população em estudo;
- As variantes estudadas não apresentaram associação com parâmetros antropométricos ou biomarcadores laboratoriais;
- As frequências dos alelos menores dos polimorfismos em estudo foram similares às encontradas em Caucasianos de outras populações.

REFERÊNCIAS

- AGIUS, L.; STUBBS, M. Investigation of the mechanism by which glucose analogues cause translocation of glucokinase in hepatocytes: evidence for two glucose binding sites. **Biochem J.** v. 346 Pt 2, p. 413-21. 2000.
- ALBERTS, B.; WILSON, J. H.; HUNT, T. **Molecular biology of the cell.** 5th. New York: Garland Science, 2008.
- ALTSHULER, D. *et al.* The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. **Nat Genet.** v. 26, n.1, p. 76-80. 2000.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.** v. 33 Suppl 1, p. S62-9. 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.** v. 34 Suppl 1, p. S62-9. 2011.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes--2015: summary of revisions. **Diabetes Care.** v. 38 Suppl, p. S4. 2015a.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes - 2015. **Diabetes Care.** v. 38, p. S1-S93. 2015b.
- ANDREINI, C. *et al.* Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. **J Proteome Res.** v. 5, n.1, p. 196-201. 2006.
- ARANGO, N. A. *et al.* Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. **Dev Biol.** v. 288, n.1, p. 276-83. 2005.
- ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. **Genome Biol.** v. 2, n.3, p. RESEARCH0007. 2001.
- ARDEN, C. *et al.* Glucokinase Is an Integral Component of the Insulin Granules in Glucose-Responsive Insulin Secretory Cells and Does Not Translocate During Glucose Stimulation. **Diabetes.** v. 53, p. 2346-2352. 2004.
- BALTRUSCH, S.; TIEDGE, M. Glucokinase Regulatory Network in Pancreatic β -Cells and Liver. **Diabetes.** v. 55, n.2, p. 55-64. 2006.
- BARATTA, M. Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. **Med Sci Monit.** v. 8, n.12, p. RA282-92. 2002.
- BEN HAROUSH, A.; YOGEV, Y.; HOD, M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. **Diabet Med.** v. 21, n.2, p. 103-13. 2004.
- BERGHOFER, A. *et al.* Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. **BMC Public Health.** v. 8, p. 200. 2008.

BITZUR, R. *et al.* Triglycerides and HDL cholesterol: stars or second leads in diabetes? **Diabetes Care**. v. 32 Suppl 2, p. S373-7. 2009.

BLOBEL, G. Intracellular protein topogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 77, n.3, p. 1496-500. 1980.

BLOBEL, G. Protein targeting (Nobel lecture). **Chembiochem**. v. 1, n.2, p. 86-102. 2000.

BONETTI, S. *et al.* Variants and haplotypes of TCF7L2 are associated with beta-cell function in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: the Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study (VNDS) 1. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 96, n.2, p. E389-93. 2011.

BOWEN, L. *et al.* The effect of CP 68,722, a thiozolidinedione derivative, on insulin sensitivity in lean and obese Zucker rats. **Metabolism**. v. 40, n.10, p. 1025-30. 1991.

BURCHFIEL, C. M. *et al.* Hyperinsulinemia and cardiovascular disease in elderly men: the Honolulu Heart Program. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 18, n.3, p. 450-7. 1998.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 5th. United States of America: Elsevier, 2012.

CAO, F. *et al.* Glucokinase regulatory protein (GCKR) gene rs4425043 polymorphism is associated with overweight and obesity in Chinese women. **Lipids**. v. 46, n.4, p. 357-63. 2011.

CARO, J. F. *et al.* Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. **Lancet**. v. 348, n.9021, p. 159-61. 1996.

CAUCHI, S. *et al.* Meta-analysis and functional effects of the SLC30A8 rs13266634 polymorphism on isolated human pancreatic islets. **Mol Genet Metab**. v. 100, n.1, p. 77-82. 2010.

CHA, S. W. *et al.* Replication of genetic effects of FTO polymorphisms on BMI in a Korean population. **Obesity (Silver Spring)**. v. 16, n.9, p. 2187-9. 2008.

CHASAPIS, C. T. *et al.* Zinc and human health: an update. **Arch Toxicol**. v. 86, n.4, p. 521-34. 2012.

CHAUHAN, G. *et al.* Common variants of FTO and the risk of obesity and type 2 diabetes in Indians. **J Hum Genet**. v. 56, n.10, p. 720-6. 2011.

CHAUSMER, A. B. Zinc, insulin and diabetes. **J Am Coll Nutr**. v. 17, n.2, p. 109-15. 1998.

CHEN, C. Y. *et al.* Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. **Pharmacol Rev**. v. 61, n.4, p. 430-81. 2009.

CHIEN, Y. W. Human insulin: Basic sciences to therapeutic uses. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 22, n.8, p. 753-789. 1996.

- CHIMIENTI, F. *et al.* Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. **Diabetes**. v. 53, n.9, p. 2330-7. 2004.
- CHIMIENTI, F. *et al.* In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. **J Cell Sci**. v. 119, n.Pt 20, p. 4199-206. 2006.
- CHRISTIANSEN, J. *et al.* IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes. **J Mol Endocrinol**. v. 43, n.5, p. 187-95. 2009.
- CHUNG, W. K. *et al.* Analysis of 30 genes (355 SNPS) related to energy homeostasis for association with adiposity in European-American and Yup'ik Eskimo populations. **Hum Hered**. v. 67, n.3, p. 193-205. 2009.
- CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell**. v. 127, n.3, p. 469-80. 2006.
- CLIFTON, I. J. *et al.* Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded beta-helix fold proteins. **J Inorg Biochem**. v. 100, n.4, p. 644-69. 2006.
- CONSIDINE, R. V. *et al.* Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. **J Clin Invest**. v. 95, n.6, p. 2986-8. 1995.
- CORKEY, B. E. Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence? **Diabetes**. v. 61, n.1, p. 4-13. 2012.
- COTO, E. *et al.* Effect of the FTO rs9930506 Polymorphism on the Main Comorbidities of the Cardiorenal Metabolic Syndrome in an Elderly Spanish Cohort. **Cardiorenal Med**. v. 4, n.2, p. 82-7. 2014.
- COUSTAN, D. R. *et al.* Maternal age and screening for gestational diabetes: a population-based study. **Obstet Gynecol**. v. 73, n.4, p. 557-61. 1989.
- CUMMINGS, D. E. *et al.* A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. **Diabetes**. v. 50, n.8, p. 1714-9. 2001.
- DAMCOTT, C. M. *et al.* Polymorphisms in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in the Amish: replication and evidence for a role in both insulin secretion and insulin resistance. **Diabetes**. v. 55, n.9, p. 2654-9. 2006.
- DARDENNES, R. M. *et al.* Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa: association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. **Psychoneuroendocrinology**. v. 32, n.2, p. 106-13. 2007.
- DATASUS. **Número de Diabéticos, Hipertensos e Diabéticos com Hipertensão por sexo, tipo e risco**. Disponível em: <<http://hiperdia.datasus.gov.br/hiperelhhiperrisco.asp>>. Acesso em: 01/08/2015.
- DE LA IGLESIA, N. *et al.* Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. **FEBS Letters**. v. 456, n.2, p. 332-338. 1999.

DEEB, S. S. *et al.* A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. **Nat Genet.** v. 20, n.3, p. 284-7. 1998.

DESMET, F. O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. **Nucleic Acids Res.** v. 37, n.9, p. e67. 2009.

DIMARAKI, E. V.; JAFFE, C. A. Role of endogenous ghrelin in growth hormone secretion, appetite regulation and metabolism. **Rev Endocr Metab Disord.** v. 7, n.4, p. 237-49. 2006.

DINA, C. *et al.* Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. **Nat Genet.** v. 39, n.6, p. 724-6. 2007.

DOSSUS, L. *et al.* Polymorphisms of genes coding for ghrelin and its receptor in relation to anthropometry, circulating levels of IGF-I and IGFBP-3, and breast cancer risk: a case-control study nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **Carcinogenesis.** v. 29, n.7, p. 1360-6. 2008.

DUESING, K. *et al.* Evaluation of the association of IGF2BP2 variants with type 2 diabetes in French Caucasians. **Diabetes.** v. 57, n.7, p. 1992-6. 2008.

ELLARD, S. *et al.* A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. **Diabetologia.** v. 43, n.2, p. 250-3. 2000.

ENDO, K. *et al.* Association of Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene and no association of Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor gene in Japanese schoolchildren with obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord.** v. 24, n.4, p. 443-9. 2000.

FAGHIH, H. *et al.* SLC30A8 gene polymorphism (rs13266634 C/T) and type 2 diabetes mellitus in south Iranian population. **Mol Biol Rep.** v. 41, n.5, p. 2709-15. 2014.

FELBER, J. P.; GOLAY, A. Pathways from obesity to diabetes. **Int J Obes Relat Metab Disord.** v. 26 Suppl 2, p. S39-45. 2002.

FLOREZ, J. C. *et al.* Effects of the type 2 diabetes-associated PPARG P12A polymorphism on progression to diabetes and response to troglitazone. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 92, n.4, p. 1502-9. 2007.

FOWLER, M. J. Classification of Diabetes: Not All Hyperglycemia is the Same. **Clinical Diabetes.** v. 25, n.2, p. 74-76. 2007.

FRAYLING, T. M. *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science.** v. 316, n.5826, p. 889-94. 2007.

FRIGERI, H. R. *et al.* The polymorphism rs2268574 in Glucokinase gene is associated with gestational Diabetes mellitus. **Clin Biochem.** v. 47, p. 499-500. 2014.

- FU, D. *et al.* Genetic polymorphism of glucokinase on the risk of type 2 diabetes and impaired glucose regulation: evidence based on 298,468 subjects. **PLoS ONE**. v. 8, n.2, p. e55727. 2013.
- FU, Y. *et al.* Down-regulation of ZnT8 expression in INS-1 rat pancreatic beta cells reduces insulin content and glucose-inducible insulin secretion. **PLoS ONE**. v. 4, n.5, p. e5679. 2009.
- FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Curr Diabetes Rev**. v. 9, n.1, p. 25-53. 2013.
- FUKADA, T. *et al.* Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. **J Biol Inorg Chem**. v. 16, n.7, p. 1123-34. 2011.
- FURUSAWA, T. *et al.* The Q223R polymorphism in LEPR is associated with obesity in Pacific Islanders. **Hum Genet**. v. 127, n.3, p. 287-94. 2010.
- GERKEN, T. *et al.* The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. **Science**. v. 318, n.5855, p. 1469-72. 2007.
- GNANAPAVAN, S. *et al.* The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 87, n.6, p. 2988. 2002.
- GRANT, S. F. *et al.* Association analysis of the FTO gene with obesity in children of Caucasian and African ancestry reveals a common tagging SNP. **PLoS ONE**. v. 3, n.3, p. e1746. 2008.
- GRANT, S. F. *et al.* Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. **Nat Genet**. v. 38, n.3, p. 320-3. 2006.
- GRARUP, N. *et al.* Studies of association of variants near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 genes with type 2 diabetes and impaired insulin release in 10,705 Danish subjects: validation and extension of genome-wide association studies. **Diabetes**. v. 56, n.12, p. 3105-11. 2007.
- GRAY, S. L. *et al.* Hyperinsulinemia precedes insulin resistance in mice lacking pancreatic beta-cell leptin signaling. **Endocrinology**. v. 151, n.9, p. 4178-86. 2010.
- GROENEWOUD, M. J. *et al.* Variants of CDKAL1 and IGF2BP2 affect first-phase insulin secretion during hyperglycaemic clamps. **Diabetologia**. v. 51, n.9, p. 1659-63. 2008.
- GU, L.; SHIGEMASA, K.; OHAMA, K. Increased expression of IGF II mRNA-binding protein 1 mRNA is associated with an advanced clinical stage and poor prognosis in patients with ovarian cancer. **Int J Oncol**. v. 24, n.3, p. 671-8. 2004.
- GUEORGUIEV, M. *et al.* Association studies on ghrelin and ghrelin receptor gene polymorphisms with obesity. **Obesity (Silver Spring)**. v. 17, n.4, p. 745-54. 2009.
- GUINAN, K. J. Worldwide distribution of type II diabetes-associated TCF7L2 SNPs: evidence for stratification in Europe. **Biochem Genet**. v. 50, n.3-4, p. 159-79. 2012.

GUNGOR, E. S.; DANISMAN, N.; MOLLAMAHMUTOGLU, L. Relationship between serum uric acid, creatinine, albumin and gestational diabetes mellitus. **Clin Chem Lab Med.** v. 44, n.8, p. 974-7. 2006.

GUTIERREZ, J. A. *et al.* Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 105, n.17, p. 6320-5. 2008.

HAMMER, N. A. *et al.* Expression of IGF-II mRNA-binding proteins (IMPs) in gonads and testicular cancer. **Reproduction.** v. 130, n.2, p. 203-12. 2005.

HASSINK, S. G. *et al.* Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. **Pediatrics.** v. 98, n.2 Pt 1, p. 201-3. 1996.

HASSOUNA, R. *et al.* A natural variant of obestatin, Q90L, inhibits ghrelin's action on food intake and GH secretion and targets NPY and GHRH neurons in mice. **PLoS ONE.** v. 7, n.12, p. e51135. 2012.

HAUSINGER, R. P. FcII/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. **Crit Rev Biochem Mol Biol.** v. 39, n.1, p. 21-68. 2004.

HAYASHI, T. *et al.* Replication study for the association of TCF7L2 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. **Diabetologia.** v. 50, n.5, p. 980-4. 2007.

HEBER, D.; CARPENTER, C. L. Addictive genes and the relationship to obesity and inflammation. **Mol Neurobiol.** v. 44, n.2, p. 160-5. 2011.

HEVENER, A. L. *et al.* Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. **Nat Med.** v. 9, n.12, p. 1491-7. 2003.

HINNEY, A. *et al.* Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. **PLoS ONE.** v. 2, n.12, p. e1361. 2007.

HOTTA, K. *et al.* Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. **J Hum Genet.** v. 53, n.6, p. 546-53. 2008.

HUANG, A.; XU, S.; CAI, X. Empirical Bayesian LASSO-logistic regression for multiple binary trait locus mapping. **BMC Genet.** v. 14, p. 5. 2013.

IDOGAWA, M. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a component of the oncogenic T-cell factor-4/beta-catenin complex. **Gastroenterology.** v. 128, n.7, p. 1919-36. 2005.

IDONIJE, B. O.; OLUBA, O. F. O. M. Plasma Glucose, Creatinine and Urea Levels in Type 2 Diabetic Patients Attending A Nigerian Teaching Hospital. **Research Journal of Medical Sciences.** v. 5, n.1, p. 1-3. 2011.

INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT. **Genotype and allele frequencies - HapMap Genome Browser release #27 (Phase 1, 2 & 3 - merged genotypes & frequencies).** Disponível em: <<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 07/04/2015.

IP, W.; CHIANG, Y. T.; JIN, T. The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective. **Cell Biosci.** v. 2, n.1, p. 28. 2012.

IRWIN, D. M.; TAN, H. Evolution of glucose utilization: glucokinase and glucokinase regulator protein. **Mol Phylogenet Evol.** v. 70, p. 195-203. 2014.

ISSELMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature.** v. 347, n.6294, p. 645-50. 1990.

IYNEDJIAN, P. B. Mammalian glucokinase and its gene. **Biochem J.** v. 293 (Pt 1), p. 1-13. 1993.

JIA, H. *et al.* Association between IGF2BP2 rs4402960 polymorphism and risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. **Arch Med Res.** v. 42, n.5, p. 361-7. 2011.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature.** v. 444, n.7121, p. 840-6. 2006.

KALNINA, I. *et al.* Stronger association of common variants in TCF7L2 gene with nonobese type 2 diabetes in the Latvian population. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.** v. 120, n.8, p. 466-8. 2012.

KAMATA, K. *et al.* Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. **Structure.** v. 12, n.3, p. 429-38. 2004.

KATSIKI, N. *et al.* Uric acid and diabetes: Is there a link? **Curr Pharm Des.** v. 19, n.27, p. 4930-7. 2013.

KEY, T. J.; VERKASALO, P. K.; BANKS, E. Epidemiology of breast cancer. **Lancet Oncol.** v. 2, n.3, p. 133-40. 2001.

KNOPP, R. H. *et al.* Relationships of lipoprotein lipids to mild fasting hyperglycemia and diabetes in pregnancy. **Diabetes Care.** v. 3, n.3, p. 416-20. 1980.

KOJIMA, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature.** v. 402, n.6762, p. 656-60. 1999.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Physiol Rev.** v. 85, n.2, p. 495-522. 2005.

KOMMOJU, U. J. *et al.* No detectable association of IGF2BP2 and SLC30A8 genes with type 2 diabetes in the population of Hyderabad, India. **Meta Gene.** v. 1, p. 15-23. 2013.

KORINEK, V. *et al.* Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. **Nat Genet.** v. 19, n.4, p. 379-83. 1998.

KURZAWSKI, M. *et al.* Analysis of common type 2 diabetes mellitus genetic risk factors in new-onset diabetes after transplantation in kidney transplant patients medicated with tacrolimus. **Eur J Clin Pharmacol.** v. 68, n.12, p. 1587-94. 2012.

LANGER, O. *et al.* Overweight and obese in gestational diabetes: the impact on pregnancy outcome. **Am J Obstet Gynecol.** v. 192, n.6, p. 1768-76. 2005.

LAPICE, E. *et al.* Pro12Ala polymorphism in the PPARG gene contributes to the development of diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients: comment on the study by Liu *et al.* **Diabetes Care.** v. 33, n.8, p. e114; author reply e115. 2010.

LATRUFFE, N.; VAMECQ, J. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. **Biochimie.** v. 79, n.2-3, p. 81-94. 1997.

LEE, G. H. *et al.* Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature.** v. 379, n.6566, p. 632-5. 1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry.** 6th. New York: W.H. Freeman, 2013.

LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. The many faces of PPARgamma. **Cell.** v. 123, n.6, p. 993-9. 2005.

LI, H. *et al.* Variants in the fat mass- and obesity-associated (FTO) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. **Diabetes.** v. 57, n.1, p. 264-8. 2008.

LI, P. *et al.* Genetic association analysis of 30 genes related to obesity in a European American population. **Int J Obes (Lond).** v. 38, n.5, p. 724-9. 2014.

LI, Y. *et al.* Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. **J Clin Invest.** v. 116, n.2, p. 506-11. 2006.

LIU, Y. *et al.* Meta-analysis added power to identify variants in FTO associated with type 2 diabetes and obesity in the Asian population. **Obesity (Silver Spring).** v. 18, n.8, p. 1619-24. 2010.

LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 20, p. 781-810. 2004.

LOVISCACH, M. *et al.* Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. **Diabetologia.** v. 43, n.3, p. 304-11. 2000.

LUPERINI, B. C. O. *et al.* Gene polymorphisms and increased DNA damage in morbidly obese women. **Mutation Research.** v. xx, n.xx, p. xx-xx. 2015 (ainda não publicado).

LYSSENKO, V. *et al.* Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. **N Engl J Med.** v. 359, n.21, p. 2220-32. 2008.

MACIEJEWSKA-KARLOWSKA, A. Polymorphic variants of the PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) genes: relevance for athletic performance. **TRENDS in Sport Sciences.** v. 1, n.10, p. 5-15. 2013.

MAGNUSON, M. A.; SHELTON, K. D. An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. **J Biol Chem**. v. 264, n.27, p. 15936-42. 1989.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**. v. 15, n.11, p. 1509-16. 1992.

MALTA, D. C. *et al.* Tendência da prevalência do diabetes melito autorreferido em adultos nas capitais brasileiras, 2006 a 2012. **Epidemiol Serv Saúde**. v. 23, n.4, p. 753-760. 2014.

MARCINKEVAGE, J. A.; NARAYAN, K. M. Gestational diabetes mellitus: Taking it to heart. **Prim Care Diabetes**. v. p. 2010.

MARTIN, G. R.; LOREDO, J. C.; SUN, G. Lack of association of ghrelin precursor gene variants and percentage body fat or serum lipid profiles. **Obesity (Silver Spring)**. v. 16, n.4, p. 908-12. 2008.

MASUGI, J. *et al.* Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 268, n.1, p. 178-82. 2000.

MATSCHINSKY, F. M. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. **Nat Rev Drug Discov**. v. 8, n.5, p. 399-416. 2009.

MATSCHINSKY, F. M.; ELLERMAN, J. E. Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. **J Biol Chem**. v. 243, n.10, p. 2730-6. 1968.

MATSCHINSKY, F. M. *et al.* The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. **Diabetes**. v. 55, n.1, p. 1-12. 2006.

MATSUOKA, N. *et al.* Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. **Diabetologia**. v. 40, n.10, p. 1204-10. 1997.

MAYANS, S. *et al.* TCF7L2 polymorphisms are associated with type 2 diabetes in northern Sweden. **Eur J Hum Genet**. v. 15, n.3, p. 342-6. 2007.

MCCARTHY, M. I. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. **N Engl J Med**. v. 363, n.24, p. 2339-50. 2010.

MEJIAS, R. *et al.* Gain-of-function glutamate receptor interacting protein 1 variants alter GluA2 recycling and surface distribution in patients with autism. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 108, n.12, p. 4920-5. 2011.

MELMED, S. *et al.* **Williams Textbook of Endocrinology**. 12th. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011.

MEMISOGLU, A. *et al.* Lack of association of the codon 12 polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene with breast cancer and body mass. **Pharmacogenetics**. v. 12, n.8, p. 597-603. 2002.

METZGER, B. E. *et al.* Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 30 Suppl 2, p. S251-60. 2007.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.** v. 16, n.3, p. 1215. 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal da Saúde: Excesso de peso atinge 54% da população do Sul**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/17452-excesso-de-peso-atinge-54-da-populacao-do-sul>>. Acesso em: 17/05/2015.

MYERS, S. A.; NIELD, A.; MYERS, M. Zinc transporters, mechanisms of action and therapeutic utility: implications for type 2 diabetes mellitus. **J Nutr Metab**. v. 2012, p. 173712. 2012.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL. Gastrintestinal surgery for severe obesity. **Ann Intern Med**. v. 115, p. 956-61. 1991.

NG, Z. Y. *et al.* Association of leptin/receptor and TNF-alpha gene variants with adolescent obesity in Malaysia. **Pediatr Int**. v. 56, n.5, p. 689-97. 2014.

NICOLSON, T. J. *et al.* Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. **Diabetes**. v. 58, n.9, p. 2070-83. 2009.

NIELSEN, J. *et al.* Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP1. **Biochem J**. v. 376, n.Pt 2, p. 383-91. 2003.

NISHIMURA, M.; NAITO, S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. **Drug Metab Pharmacokinet**. v. 23, n.1, p. 22-44. 2008.

NUSSE, R.; VARMUS, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. **Cell**. v. 31, n.1, p. 99-109. 1982.

OLEYNIKOV, Y.; SINGER, R. H. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. **Curr Biol**. v. 13, n.3, p. 199-207. 2003.

OPGEN-RHEIN, C. *et al.* Association of HTR2C, but not LEP or INSIG2, genes with antipsychotic-induced weight gain in a German sample. **Pharmacogenomics**. v. 11, n.6, p. 773-80. 2010.

ORITA, M. *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 86, n.8, p. 2766-70. 1989.

OSWAL, A.; YEO, G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. **Obesity (Silver Spring)**. v. 18, n.2, p. 221-9. 2010.

PALMA-REIS, I. *et al.* Renal disease and hypertension in pregnancy. **Clin Med**. v. 13, n.1, p. 57-62. 2013.

PALMER, N. D. *et al.* Quantitative trait analysis of type 2 diabetes susceptibility loci identified from whole genome association studies in the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. **Diabetes**. v. 57, n.4, p. 1093-100. 2008.

PARACCHINI, V.; PEDOTTI, P.; TAIOLI, E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. **Am J Epidemiol**. v. 162, n.2, p. 101-14. 2005.

PERRET, J.; DE VRIESE, C.; DELPORTE, C. Polymorphisms for ghrelin with consequences on satiety and metabolic alterations. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v. 17, n.4, p. 306-11. 2014.

PERRONE, R. D.; MADIAS, N. E.; LEVEY, A. S. Serum Creatinine as an Index of Renal Function: New Insights into Old Concepts. **Clin Chem**. v. 38, n.10, p. 1933-1953. 1992.

PRESTWICH, T. C.; MACDOUGALD, O. A. Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism. **Curr Opin Cell Biol**. v. 19, n.6, p. 612-7. 2007.

PRICE, R. A.; LI, W. D.; ZHAO, H. FTO gene SNPs associated with extreme obesity in cases, controls and extremely discordant sister pairs. **BMC Med Genet**. v. 9, p. 4. 2008.

PRUNIER, C.; HOCEVAR, B. A.; HOWE, P. H. Wnt signaling: physiology and pathology. **Growth Factors**. v. 22, n.3, p. 141-50. 2004.

QI, Q. *et al.* Association of GCKR rs780094, alone or in combination with GCK rs1799884, with type 2 diabetes and related traits in a Han Chinese population. **Diabetologia**. v. 52, n.5, p. 834-43. 2009.

QUINTON, N. D. *et al.* A single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin receptor is associated with BMI, fat mass and leptin levels in postmenopausal Caucasian women. **Hum Genet**. v. 108, n.3, p. 233-6. 2001.

RAITAKARI, O. T. *et al.* Variation of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene predicts impaired fasting glucose in healthy young adults: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Diabetes Care**. v. 30, n.9, p. 2299-301. 2007.

RIJSEWIJK, F. *et al.* The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. **Cell**. v. 50, n.4, p. 649-57. 1987.

ROCHA, R. A. *et al.* Preproghrelin polymorphism Q90L (rs4684677) in gestational diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 58, n.1, p. 83-4. 2014.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. **J Biol Chem**. v. 276, n.41, p. 37731-4. 2001.

ROSENBERG, T. J. *et al.* Maternal obesity and diabetes as risk factors for adverse pregnancy outcomes: differences among 4 racial/ethnic groups. **Am J Public Health**. v. 95, n.9, p. 1545-51. 2005.

RUZZO, A.; ANDREONI, F.; MAGNANI, M. Structure of the human hexokinase type I gene and nucleotide sequence of the 5' flanking region. **Biochem J.** v. 331, p. p. 607-613. 1998.

SALOPURO, T. *et al.* Genetic variation in leptin receptor gene is associated with type 2 diabetes and body weight: The Finnish Diabetes Prevention Study. **Int J Obes (Lond)**. v. 29, n.10, p. 1245-51. 2005.

SCOTT, D. A. Crystalline insulin. **Biochem J**. v. 28, n.4, p. 1592-1602 1. 1934.

SEIM, I. *et al.* Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. **BMC Genomics**. v. 8, p. 298. 2007.

SENTINELLI, F. *et al.* Association of FTO polymorphisms with early age of obesity in obese Italian subjects. **Exp Diabetes Res**. v. 2012, p. 872176. 2012.

SHANIK, M. H. *et al.* Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? **Diabetes Care**. v. 31 Suppl 2, p. S262-8. 2008.

SHIYA, T. *et al.* Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 87, n.1, p. 240-4. 2002.

SHITASHIGE, M.; HIROHASHI, S.; YAMADA, T. Wnt signaling inside the nucleus. **Cancer Sci**. v. 99, n.4, p. 631-7. 2008.

SHU, L. *et al.* Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets. **Diabetes**. v. 57, n.3, p. 645-53. 2008.

SLADEK, R. *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**. v. 445, n.7130, p. 881-5. 2007.

SMEMO, S. *et al.* Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. **Nature**. v. 507, n.7492, p. 371-5. 2014.

SMITH, U. TCF7L2 and type 2 diabetes--we WNT to know. **Diabetologia**. v. 50, n.1, p. 5-7. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretriz de Telecardiologia no Cuidado de Pacientes com Síndrome Coronariana Aguda e Outras Doenças Cardíacas. **Arq Bras Cardiol**. v. 104, n.5 (Supl. 1), p. 374. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2014-2015. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. v. p. 374. 2015.

SPARSO, T. *et al.* The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes. **Diabetologia**. v. 51, n.1, p. 70-5. 2008.

SPIEGELMAN, B. M. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes**. v. 47, n.4, p. 507-14. 1998.

STAIGER, H. *et al.* Polymorphisms within novel risk loci for type 2 diabetes determine beta-cell function. **PLoS ONE**. v. 2, n.9, p. e832. 2007.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética Molecular Humana**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

STRATIGOPOULOS, G. *et al.* Functional consequences of the human leptin receptor (LEPR) Q223R transversion. **Obesity (Silver Spring)**. v. 17, n.1, p. 126-35. 2009.

STUMVOLL, M.; HARING, H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. **Diabetes**. v. 51, n.8, p. 2341-7. 2002.

SUN, L. *et al.* [The application of a high resolution melting-based genotyping method in studying the association between FTO rs9930506 polymorphism and metabolic syndrome in Beijing population]. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**. v. 51, n.1, p. 8-12. 2012.

TABASSUM, R. *et al.* Common Variants of IL6, LEPR, and PBEF1 Are Associated With Obesity in Indian Children. **Diabetes**. v. 61, n.3, p. 626-31. 2012.

TAKEDA, J. *et al.* Structure/function studies of human beta-cell glucokinase. Enzymatic properties of a sequence polymorphism, mutations associated with diabetes, and other site-directed mutants. **J Biol Chem**. v. 268, n.20, p. 15200-4. 1993.

TARTAGLIA, L. A. *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**. v. 83, n.7, p. 1263-71. 1995.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 51, n.4, p. 526-33. 2007.

TINTO, N. *et al.* Glucokinase gene mutations: structural and genotype-phenotype analyses in MODY children from South Italy. **PLoS ONE**. v. 3, n.4, p. e1870. 2008.

TONG, Y. *et al.* Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. **BMC Med Genet**. v. 10, p. 15. 2009.

TOOBERT, D. J. *et al.* Long-term effects of the Mediterranean lifestyle program: a randomized clinical trial for postmenopausal women with type 2 diabetes. **Int J Behav Nutr Phys Act**. v. 4, p. 1. 2007.

TSCHOP, M. *et al.* Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. **J Endocrinol Invest**. v. 24, n.6, p. RC19-21. 2001.

TUNG, Y. C. *et al.* Obesity and FTO: Changing Focus at a Complex Locus. **Cell Metab**. v. 20, n.5, p. 710-718. 2014.

VALEGARD, K. *et al.* Structure of a cephalosporin synthase. **Nature**. v. 394, n.6695, p. 805-9. 1998.

VAN DER LELY, A. J. *et al.* Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. **Endocr Rev**. v. 25, n.3, p. 426-57. 2004.

VAN SCHAFTINGEN, E.; VEIGA-DA-CUNHA, M.; NICULESCU, L. The regulatory protein of glucokinase. **Biochem Soc Trans**. v. 25, n.1, p. 136-40. 1997.

VON HEIJNE, G. Signal sequences. The limits of variation. **J Mol Biol**. v. 184, n.1, p. 99-105. 1985.

VON HEIJNE, G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. **Nucleic Acids Res**. v. 14, n.11, p. 4683-90. 1986.

WALLACH, J. **Interpretação de Exames Laboratoriais**. 8ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2009.

WAUMAN, J.; TAVERNIER, J. Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance. **Front Biosci (Landmark Ed)**. v. 16, p. 2771-93. 2011.

WAUTERS, M. *et al.* Polymorphisms in the leptin receptor gene, body composition and fat distribution in overweight and obese women. **Int J Obes Relat Metab Disord**. v. 25, n.5, p. 714-20. 2001.

WEEDON, M. N. *et al.* A common haplotype of the glucokinase gene alters fasting glucose and birth weight: association in six studies and population-genetics analyses. **Am J Hum Genet**. v. 79, n.6, p. 991-1001. 2006.

WEIJERS, R. N. Three-dimensional structure of beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, predicted from the type 2 diabetes-associated gene variant SLC30A8 R325W. **Diabetol Metab Syndr**. v. 2, n.1, p. 33. 2010.

WILD, S. *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**. v. 27, n.5, p. 1047-53. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 26/03/2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory (GHO) data: Situation and trends**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/>. Acesso em: 03/06/2015.

WU, R. *et al.* Genetic predictors of antipsychotic-induced weight gain: a case-matched multi-gene study. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**. v. 36, n.8, p. 720-3. 2011.

XIONG, X. *et al.* Gestational diabetes mellitus: prevalence, risk factors, maternal and infant outcomes. **Int J Gynaecol Obstet**. v. 75, n.3, p. 221-8. 2001.

YAMAMOTO, Y. *et al.* PPAR(γ)2 gene Pro12Ala polymorphism may influence serum level of an adipocyte-derived protein, adiponectin, in the Japanese population. **Metabolism**. v. 51, n.11, p. 1407-9. 2002.

YANG, J. *et al.* Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. **Cell**. v. 132, n.3, p. 387-96. 2008.

YE, J. Role of insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**. v. 7, n.1, p. 65-74. 2007.

YE, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Front Med**. v. 7, n.1, p. 14-24. 2013.

YEN, C. J. *et al.* Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 241, n.2, p. 270-4. 1997.

YESSOUFOU, A.; WAHLI, W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. **Swiss Med Wkly**. v. 140, p. w13071. 2010.

YI, F.; BRUBAKER, P. L.; JIN, T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. **J Biol Chem**. v. 280, n.2, p. 1457-64. 2005.

YI, N.; BANERJEE, S. Hierarchical generalized linear models for multiple quantitative trait locus mapping. **Genetics**. v. 181, p. 1101-1133. 2009.

ZEGGINI, E. A new era for Type 2 diabetes genetics. **Diabet Med**. v. 24, n.11, p. 1181-6. 2007.

ZHANG, J. V. *et al.* Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. **Science**. v. 310, n.5750, p. 996-9. 2005.

ZHAO, A. Z.; BORNFELDT, K. E.; BEAVO, J. A. Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. **J Clin Invest**. v. 102, n.5, p. 869-73. 1998.

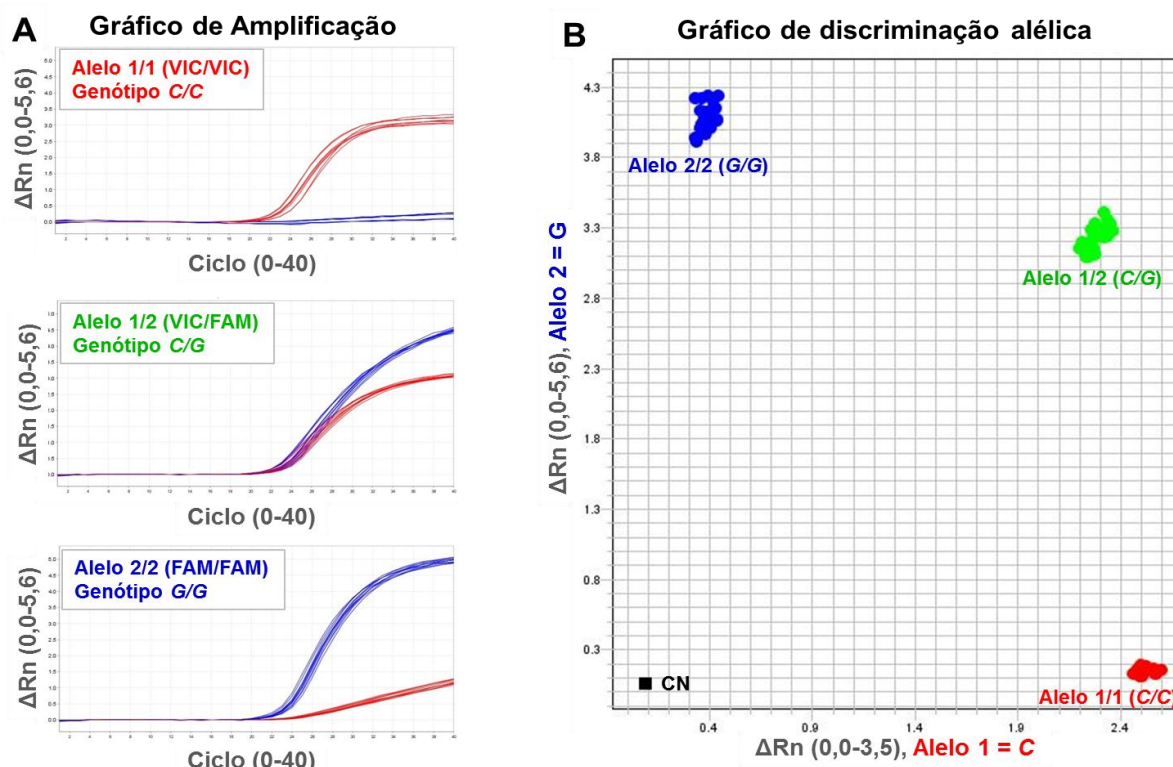
ZHAO, Y. *et al.* IGF2BP2 genetic variation and type 2 diabetes: a global meta-analysis. **DNA Cell Biol**. v. 31, n.5, p. 713-20. 2012.

ZHENG, X. *et al.* Association of type 2 diabetes susceptibility genes (TCF7L2, SLC30A8, PCSK1 and PCSK2) and proinsulin conversion in a Chinese population. **Mol Biol Rep**. v. p. 2011.

ZHOU, Y. *et al.* The formation of brown adipose tissue induced by transgenic over-expression of PPARgamma2. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 446, n.4, p. 959-64. 2014.

ZHU, Y. *et al.* Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 92, n.17, p. 7921-5. 1995.

APÊNDICE

FIGURA 23 – EXEMPLO DE PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO (A) E DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA (B) DO MÉTODO DE *TAQMAN*[®].

Perfil de amplificação (A) e de discriminação alélica (B) do polimorfismo *rs7901695* (*TCF7L2*) estudado. Os outros resultados *Taqman*[®] obtiveram perfis similares.

ΔRn (Delta Rn), resultado do valor de Rn subtraído do ruído individual de cada amostra. Rn é o resultado da Fluorescência dividida pelo fluoróforo ROX. A emissão da fluorescência dos amplicons foi detectada pelo equipamento no ciclo 22 de um total de 40 ciclos. CN, controles negativos (dois poços na placa). Três controles positivos (repetições de amostras as quais continham cada um dos alelos) foram utilizados nos ensaios. Estes, ao contrário do CN, não estão mostrados isoladamente na figura, pois o *software* do equipamento não realiza essa separação, colocando-os com as outras amostras discriminadas. Os resultados informados pelo *software* do equipamento apresentam 98,00% de certeza na discriminação alélica (B). Além disso, cada amostra também foi conferida manualmente pela análise da curva de amplificação (A).